


MARCOS LUENGO BLANCO

***EFEITOS DA GELÉIA REAL SOBRE A RESPOSTA
HEMATOPOÉTICA EM CAMUNDONGOS
PORTADORES DO TUMOR ASCÍTICO
DE EHRLICH***

Este exemplar corresponde à versão final da Dissertação de Mestrado, apresentada à Pós-Graduação da Faculdade de Ciências Médicas - UNICAMP, para obtenção do título de Mestre em Farmacologia do Farmacêutico Marcos Luengo Blanco.

Campinas, 19 de outubro de 2001.


*Profa. Dra. Claudia Bincoletto Trindade
- Orientadora -*

CAMPINAS

2001

MARCOS LUENGO BLANCO

***EFEITOS DA GELÉIA REAL SOBRE A RESPOSTA
HEMATOPOÉTICA EM CAMUNDONGOS
PORTADORES DO TUMOR ASCÍTICO
DE EHRLICH***

*Dissertação de Mestrado apresentada à Pós-Graduação
da Faculdade de Ciências Médicas da Universidade
Estadual de Campinas para obtenção do Título de Mestre
em Farmacologia.*

Orientadora: Profa. Dra. Cláudia Bincoletto Trindade

CAMPINAS

2001

ii

UNICAMP
BIBLIOTECA CENTRAL
SEÇÃO CIRCULANTE

**FICHA CATALOGRÁFICA ELABORADA PELA
BIBLIOTECA DA FACULDADE DE CIÊNCIAS MÉDICAS
UNICAMP**

B598e

Blanco, Marcos Luengo

Efeitos da geléia real sobre a resposta hematopoética em camundongos portadores do tumor ascítico de Ehrlich / Marcos Luengo Blanco. Campinas, SP : [s.n.], 2001.

Orientador : Cláudia Bincoletto Trindade

Dissertação (Mestrado) Universidade Estadual de Campinas.
Faculdade de Ciências Médicas.

1. Hematopoése. I. Cláudia Bincoletto Trindade. II. Universidade Estadual de Campinas. Faculdade de Ciências Médicas. III. Título.

UNIDADE	B8
Nº CHAMADA	T/UNICAMP
	B598e
V	
TR	48567
PR	16-837102
C	<input type="checkbox"/>
D	<input checked="" type="checkbox"/>
PREÇO	R\$ 11,00
DATA	
Nº CPD	

CM00166902-6

BIB ID 238395





[Redacted text]

Orientador:

[Redacted text]

[Redacted text]

Profa. Dra. Cláudia Bincoletto Trindade

Profa. Dra. Mary Luci De Souza Queiroz

Prof. Dr. Hélio dos Santos Dutra

**Programa de Pós-Graduação em Farmacologia da Faculdade de Ciências Médicas
da Universidade Estadual de Campinas.**

Data: 19/10/2001

200621787

DEDICATÓRIA

À minha família pela dedicação amorosa;

A todos meus professores, pelo estímulo e motivação de sempre seguir adiante, em busca do que eu mais queria e ao meu pai (in memoriam) por seu amor tranquilo e sereno.

À minha família que sempre esteve presente.

À Professora Dra. Cláudia Bincoletto Trindade, orientadora deste trabalho, a quem agradeço por tudo. Se eu tivesse que enumerar todas as coisas, seguramente faltaria alguma. Portanto, é infinita minha gratidão.

À Professora Dra. Mary Luci de Souza Queiroz, por quem tenho imensa admiração e respeito.

A todos os amigos do laboratório, presentes e ausentes, os quais, sempre estarão em minha memória, porque estes fazem parte da história da minha vida.

Agradeço aos animais, que participaram deste trabalho, pois sem a existência deles nada disso seria possível.

Ao Conselho Nacional de Desenvolvimento e Pesquisa (CNPq), pelo apoio financeiro.

Aos Departamentos de Farmacologia, de Comunicação Social do HEMOCAMP e à Diretoria de Apoio Didático, Científico Computacional da FCM, os quais viabilizaram a elaboração desta dissertação de mestrado.

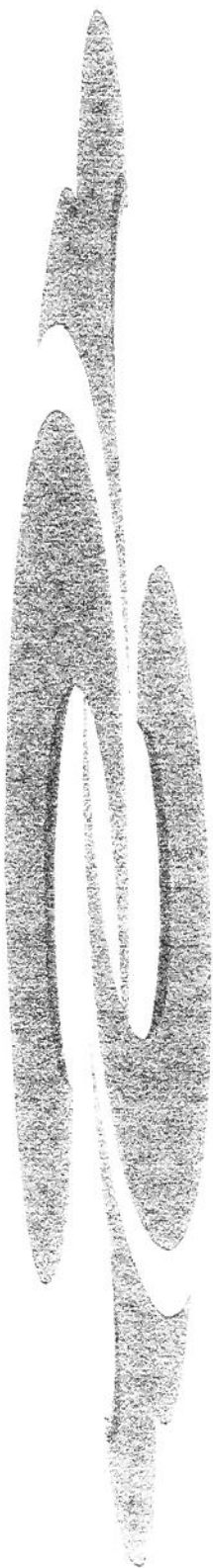
	PAG.
RESUMO.....	<i>xi</i>
1. INTRODUÇÃO.....	14
2. OBJETIVOS.....	21
3. MATERIAL E MÉTODOS.....	23
3.1. Geléia Real (GR).....	24
3.1.1. Verificação da solubilidade da GR em meio alcalino para comprovação de sua pureza	24
3.2. Animais e tratamento com GR.....	24
3.3. Obtenção do Tumor Ascítico de Ehrlich (TAE).....	26
3.4. Cultura clonal de precursores hematopoéticos para granulócitos e macrófagos (CFU-GM) de Medula Óssea e Baço de Camundongos.....	26
3.5. Peso do baço dos animais submetidos aos referidos tratamentos.....	28
3.6. Preparação do meio condicionado de células esplênicas (SCM).....	28
3.7. Obtenção do soro dos animais para detecção da atividade dos fatores estimuladores de colônias.....	29
3.8. Contagem diferencial de células da medula óssea.....	30
3.9. Cultura líquida de longa duração de tecido hematopoético.....	31
3.9.1. Cultura clonal de precursores hematopoéticos (CFU-C) in vitro do sobrenadante das culturas líquidas de longa duração	31

3.10. Curva de sobrevivência.....	33
3.11. Análise estatística.....	33
4. RESULTADOS.....	34
4.1. Efeitos da GR sobre os precursores hematopoéticos (CFU-C) da medula óssea e baço de camundongos BALB-c.....	35
4.1.1. Medula óssea.....	35
4.1.2. Baço.....	35
4.2. Efeitos da GR sobre o peso do baço.....	38
4.3. Efeitos da GR sobre a produção de fatores estimuladores de colônia.....	38
4.4. Efeitos da GR sobre a contagem diferencial de células da medula óssea..	40
4.5. Efeitos da GR na sobrevivência de animais inoculados com TAE.....	42
4.6. Efeitos da GR sobre o estroma medular in vitro de camundongos BALB-c normais.....	43
5. DISCUSSÃO.....	45
6. CONCLUSÕES.....	50
7. SUMMARY.....	52
8. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....	54
9. APÊNDICES.....	65

	PÁG.
Tabela 1. Titulação do meio condicionado de células esplênicas (SCM) em presença de células de medula óssea de camundongos BALB/c (1 x 10 ⁵ células/Ml.....	29
Tabela 2. Efeitos da GR sobre a contagem diferencial de células da medula óssea de camundongos BALB/c pré tratados por 20 dias com GR (500 mg/kg) e inoculados com TAE (6x10 ⁶ cel./animal - i.p.) o tratamento com GR foi mantido por mais 8 dias após a inoculação tumoral.....	41
Tabela 3. Efeitos da GR sobre o crescimento e diferenciação de precursores hematopoéticos da medula óssea em camundongos BALB-c inoculados com o TAE e tratados com 500 mg/kg.....	65
Tabela 4. Efeitos da GR sobre o crescimento e diferenciação de precursores hematopoéticos da medula óssea em camundongos BALB-c inoculados com o TAE e tratados com 1000 mg/kg.....	66
Tabela 5. Efeitos da GR sobre o crescimento e diferenciação de precursores hematopoéticos da medula óssea em camundongos BALB-c inoculados com o TAE e tratados com 1500 mg/kg.....	67
Tabela 6. Efeitos da GR sobre o crescimento e diferenciação de precursores hematopoéticos do baço em camundongos BALB-c inoculados com o TAE e tratados com 500 mg/kg.....	68
Tabela 7. Efeitos da GR sobre o crescimento e diferenciação de precursores hematopoéticos do baço em camundongos BALB-c inoculados com o TAE e tratados com 1000 mg/kg.....	69

Tabela 8. Efeitos da GR sobre o crescimento e diferenciação de precursores hematopoéticos do baço em camundongos BALB-c inoculados com o TAE e tratados com 1500 mg/kg.....	70
Tabela 9. Variação do peso do baço de camundongos BALB-c inoculados com o TAE e tratados com 500 mg/kg.....	71
Tabela 10. Variação do peso do baço de camundongos BALB-c inoculados com o TAE e tratados com 1000 mg/kg.....	72
Tabela 11. Variação do peso do baço em camundongos BALB-c inoculados com o TAE e tratados com 1500 mg/kg.....	73
Tabela 12. Efeitos da produção de fatores estimuladores de colônia de células precursoras hematopoéticas em camundongos BALB-c inoculados com o TAE e tratados com 500 mg/kg.....	74
Tabela 13. Efeitos da GR sobre o estroma medular <i>in vitro</i> de camundongos BALB-c normais.....	75

	PÁG.
Figura 1. Alterações imuno-hematológicas induzidas pelo TAE.....	19
Figura 2. Esquema do protocolo profilático terapêutico.....	25
Figura 3. Fotomicrografia de uma colônia de células precursoras hematopoéticas da medula óssea.....	27
Figura 4. Capacidade estimuladora do crescimento de colônias do meio condicionado de células do baço (SCM) expressa em unidades por mL.....	30
Figura 5. A) Fotomicrografia de células aderentes do estroma medular de camundongos BALB-c e B) Fotomicrografia de uma colônia de células progenitoras (CFU-C), obtida pela estimulação in vitro das células do sobrenadante desta cultura.....	32
Figura 6. Efeitos da GR (500, 1000 e 1500 mg/kg) sobre o crescimento e diferenciação de precursores hematopoéticos da medula óssea de camundongos BALB/c portadores do TAE.....	36
Figura 7. Efeitos da GR (500, 1000 e 1500 mg/kg) sobre o crescimento e diferenciação de precursores hematopoéticos do baço de camundongos BALB-c portadores do TAE.....	37
Figura 8. Atividade estimuladora de colônias do soro de camundongos BALB-c inoculados com TAE e tratados com 500 mg/kg de GR.....	39
Figura 9. Avaliação dos efeitos da administração da GR (500; 1000 e 1500 mg/kg) na resistência de camundongos BALB-c inoculados com células do Tumor Ascítico de Ehrlich (6×10^6 cel/animal).....	42
Figura 10. A) Efeitos da GR (100 ou 500 mg/L) sobre a celularidade do sobrenadante da cultura de longa duração do estroma medular de animais normais in vitro. B) Efeitos da GR (100 ou 500 mg/L) sobre o número de células formadoras de colônias (CFU-C) obtido no sobrenadante da cultura líquida de longa duração do estroma medular de animais normais in vitro.....	44



RESUMO

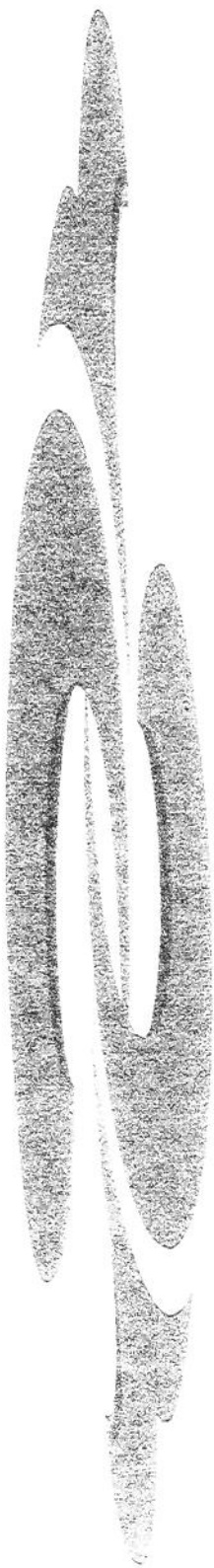
Diante da importância da resposta hematopoética na sobrevivência de animais portadores do Tumor Ascítico de Ehrlich (TAE), neste trabalho avaliou-se os efeitos *in vivo* da Geléia Real (GR) sobre a hematopoese medular e esplênica de animais portadores do TAE.

Camundongos machos BALB-c foram tratados por vinte dias com 500, 1000 ou 1500 mg/kg de GR, a qual foi administrada por via oral, no vigésimo dia de tratamento estes animais foram inoculados com 6×10^6 células do TAE e após inoculação tumoral, o tratamento com GR foi mantido por mais 3, 8 ou 13 dias. Vinte e quatro horas após a última dose de GR, a medula óssea e o baço destes animais foram retirados para a realização da análise quantitativa das células formadoras de colônias (CFU-C), a qual foi realizada através da técnica de cultura clonal em meio semi-sólido.

Os resultados demonstraram que o TAE induz uma diminuição no número de CFU-C da medula óssea e um aumento deste número no baço. Entretanto, quando estes animais receberam o tratamento profilático/terapêutico com as três doses de GR, esta mielossupressão foi totalmente prevenida a partir do oitavo dia de inoculação tumoral, sendo que o número de CFU-C na medula óssea de animais portadores do TAE e tratados com 500 mg/kg apresentou-se aumentado em relação ao controle normal (sem tratamento). Com relação a hematopoese esplênica, manifestada nos animais portadores do TAE, observou-se uma redução no número de CFU-C frente ao tratamento com GR, sendo que nas doses de 500 e 1000 mg/kg, foram obtidos valores próximos ao dos animais normais nos três períodos avaliados após a inoculação tumoral. O tratamento de animais normais com a GR não alterou o número de CFU-C na medula óssea e no baço. Quanto à presença de fatores estimuladores de colônias no soro dos animais portadores do TAE e tratados com 500 mg/kg de GR, verificou-se neste grupo, uma inibição parcial na produção destes fatores em relação aos animais apenas portadores do TAE.

Os efeitos estimulatórios da GR sobre a hematopoese medular foram mais uma vez observados ao se avaliar os efeitos *in vitro* deste composto sobre o estroma medular de animais normais. Estes experimentos demonstraram que a GR, nas doses de 100 e 500 mg/L, é capaz de estimular o tecido estromal, aumentando tanto a celularidade, como o número de CFU-C no sobrenadante das culturas líquidas.

Diante do exposto, pode-se concluir que a GR possui a capacidade de aumentar a sobrevivência dos animais portadores do TAE, possivelmente através de um restabelecimento parcial da hematopoese medular e esplênica.



1. INTRODUÇÃO

A procura do homem pela cura das enfermidades levou-o à descoberta de novos fármacos e ao desenvolvimento de técnicas que possibilitaram alterar o curso natural de algumas doenças, como por exemplo, a descoberta da penicilina por Fleming em 1929. (GERALD *et al.*, 1997)

A partir da década de 40, houve uma grande expansão do arsenal terapêutico de vários fármacos, entre eles, os agentes citotóxicos, os quais começaram a ser utilizados com o objetivo de erradicar os clones de células malignas. Entretanto, o sucesso no tratamento de diversos tumores malignos ainda é bastante modesto, fazendo do câncer uma doença com elevada incidência de mortalidade. Este alto índice de mortalidade está relacionado, na maioria dos casos, não só com a própria agressividade da doença, mas também com a toxicidade medular, a qual limita a dose dos agentes antineoplásicos utilizados, possibilitando a sobrevivência de alguns clones de células malignas. (RAFFERTY *et al.*, 1996).

Diante disto, a pesquisa de novas substâncias com potencial imunomodulador torna-se fundamental, uma vez que estas substâncias visam aumentar ou restabelecer os mecanismos de defesa próprios do hospedeiro para agirem contra as células neoplásicas, sem os efeitos colaterais graves dos quimioterápicos. Entre as substâncias com potencial imunomodulador, podemos citar algumas pró-vitaminas, agentes anti-oxidantes, produtos naturais e alguns complementos alimentares (YAMAGUCHI & INOCÊNCIO, 1993; ERNST & CASSILETH, 1999; VERHOEF, HILSDEN, BEIRNE, 1999), como por exemplo a GR. Vários trabalhos científicos da literatura demonstram o interesse por estabelecer as prováveis ações farmacológicas deste composto (TOWNSEND, MORGAN, HAZLETT, 1959; KOHASHI, TOMITA, IWAI, 1980; SEVER *et al.*, 1996; HAMERLINCK, 1999).

A GR é produzida e secretada pelas glândulas mandibulares hipofaríngeas das abelhas operárias jovens *Apis mellifera* Linné, sendo produzida a partir de água, pólen e mel. É uma substância viscosa, de coloração branco-amarelada ou branco-acinzentada, levemente opalescente, de odor característico e pungente, porém não desagradável ou rançosa, também conhecida como leite da abelha rainha. Este produto é extremamente importante para a manutenção da colméia, pois serve de alimento para as larvas em desenvolvimento e para a abelha rainha por toda a sua vida, permitindo que a mesma viva 60 vezes mais do que as abelhas operárias (HAYDAK & PALMER, 1942; HAYDAK,

1943; PRATT & HOUSE, 1949; WEAVER & KUIKEN, 1951). A indiscutível vitalidade que a dieta rica em GR proporciona à abelha rainha, tem incitado o interesse do público que busca a fórmula da longevidade, sendo provavelmente a única substância no mundo capaz de desacelerar o curso natural do relógio biológico que determina o tempo de vida no reino animal (GARCIA-AMOEDO, 1999).

A utilização da GR pelo homem baseia-se principalmente no conhecimento popular e é indicada para prevenir e/ou combater os mais variados tipos de doenças, como problemas das vias respiratórias, úlcera gástrica, reumatismo, colesterol e triglicerídeos elevados. Além disso, a GR também parece apresentar propriedades rejuvenescedoras da pele e estimulantes do apetite (CHO, 1977). Este composto é um alimento completo e equilibrado, constituído de mais de 43 componentes, como proteínas, aminoácidos (arginina, histidina, isoleucina, leucina, lisina, metionina, fenilalanina, treonina, triptofano e valina), carboidratos, ácidos graxos, nucleotídeos, vitaminas E e B6 (WEAVER & KUIKEN, 1951; PATEL, HAYDAK, GOCHNAUER, 1960; KARAALI, MEYDANOGLU, EKE, 1998), minerais entre outras.

Substâncias importantes, do ponto de vista farmacológico, foram identificadas na fração lipídica da GR, como por exemplo, o ácido 10-hidroxi-D 2-decenóico (10-HDA) (BLOODWORTH *et al.*, 1995; BARKER *et al.*, 1959); ácido 8-hidroxi-octanóico, 3-hidroxi-decanóico e o 3,10-dihidroxi-decanóico (WEAVER *et al.*, 1969). A atividade antibiótica do 10-HDA foi motivo de estudo para BLUM, NOVAK, TABER, (1959). Estes autores verificaram que o 10-HDA é o principal componente da fração lipídica da GR e apresenta atividade antibiótica contra bactérias e fungos. Conforme os autores, este ácido graxo apresenta potência antimicrobiana de até 1/4 da penicilina, contra *Micrococcus piogenes*, e de até 1/5 da atividade da clortetraciclina contra *Escherichia coli* (NASSIS *et al.*, 1995; FUJIWARA *et al.*, 1990). FUJIWARA *et al.*, (1990) também identificaram na GR uma proteína com potente efeito antimicrobiano *in vitro*, em pequenas concentrações, contra cocos Gram-positivos e a denominaram de “Royalisin”. Estes autores sugeriram, então, que as abelhas produzem certas substâncias com potencial antimicrobiano para proteger a colméia do ataque de microrganismos.

Várias pesquisas científicas têm explorado as propriedades imunomoduladoras da GR bruta, e de seus componentes isolados. Neste sentido, KIMURA, WASHINO, YONEKURA, (1995) e KIMURA *et al.* (1996), isolaram algumas glicoproteínas da GR

e verificaram que estas substâncias apresentavam atividade estimuladora da proliferação de monócitos humanos *in vitro* e também eram capazes de manter a viabilidade de células hepáticas de ratos em cultura primária. Recentemente, demonstrou-se a presença das neopterinas (pteridinas de estruturas heterocíclicas derivadas do núcleo pirazino-2,3-d-pirimidina) na GR (KOHASHI *et al.*, 1980). As neopterinas também possuem varias aplicações clínicas, como por exemplo em pacientes com infecções virais, nos quais induzem um aumento do número de monócitos e macrófagos como consequência da estimulação da produção de interferon-gama (HAMERLINCK, 1999). Além disso, as neopterinas são capazes de estimular o sistema hematopoético, através de um aumento na produção de interleucina 6 (IL-6) e de fatores estimuladores de colônias para granulócitos e macrófagos (GM-CSF) (AIZAWA *et al.*, 1998).

Com relação aos trabalhos científicos que exploram a GR bruta, SVER *et al.* em 1996 relataram efeitos controversos deste composto sobre o sistema imunológico, como aumento de linfócitos circulantes em camundongos e diminuição da produção de imunoglobulinas em ratos. A atividade antimutagênica da GR também foi comprovada com o teste Ames (BARILIAK, BERDYSHEV, DUGAN, 1996).

Um outro efeito importante da GR bruta, verificado na literatura, parece ser a atividade antitumoral. TAMURA, FUJII, KUBOYAMAN, (1987) observaram um aumento na sobrevida de animais inoculados com varias linhagens de células tumorais como leucemia L1210, P388 e células de Ehrlich, quando tratados com GR (10 e 1000 mg/kg/dia). Além disso, nos casos onde foi feito um tratamento profilático com a GR, houve inibição do crescimento tumoral em aproximadamente 50 % dos animais submetidos às duas doses utilizadas.

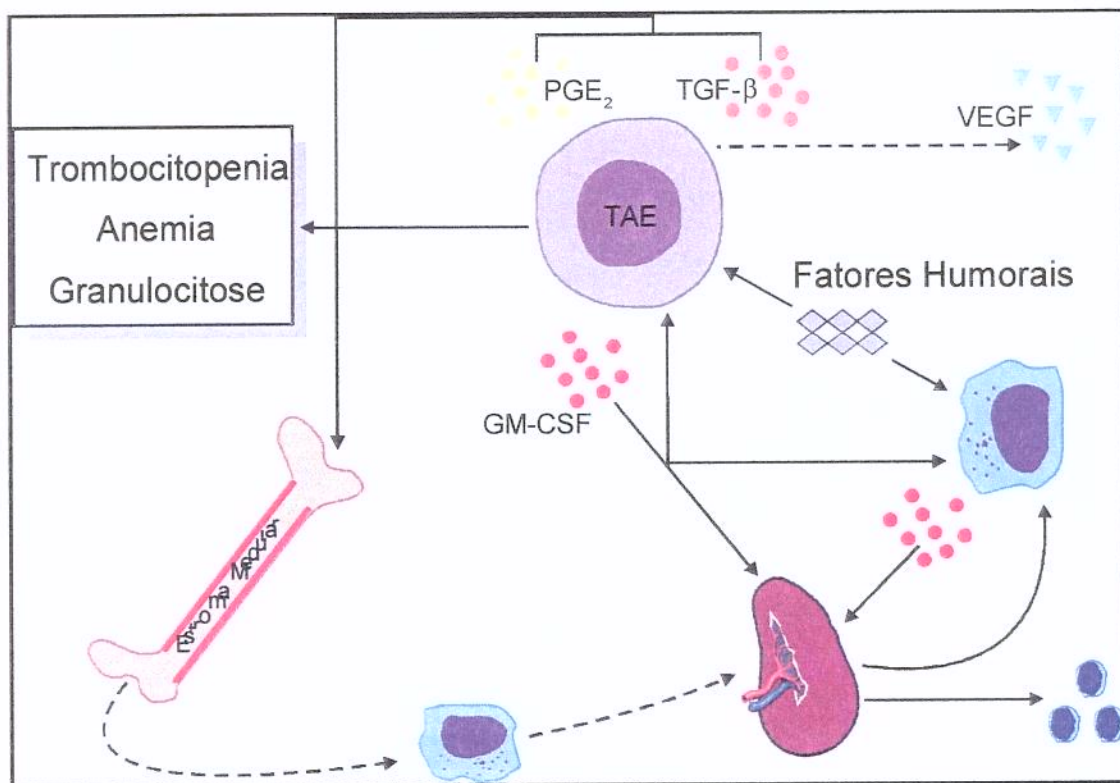
Diante do exposto, torna-se clara a necessidade de estudos adicionais para que se avalie as propriedades imunomoduladoras que possam estar presentes na GR. Nesse sentido, utilizando um modelo experimental de implantação tumoral, avaliou-se a resposta hematopoética em camundongos tratados com GR, sendo que as alterações hematopoéticas em humanos e animais são parecidos frente ao desenvolvimento tumoral (LASZLO *et al.*, 1982). O modelo experimental utilizado neste estudo foi o de camundongos portadores do Tumor Ascítico de Ehrlich (TAE). Este tumor foi descrito por EHRlich & APOLANT (1905) como um adenocarcinoma de mama, que teve origem espontaneamente em camundongos fêmeas. O tumor de Ehrlich caracteriza-se por não regredir espontaneamente

e ser um tumor facilmente mantido por transplantes sucessivos no tecido subcutâneo ou no peritônio de qualquer linhagem murina, desenvolvendo-se na forma sólida ou ascítica, respectivamente (SIGIURA, 1965).

Diferentes patologistas têm diagnosticado o tumor de Ehrlich como um carcinoma. Entretanto, as definições como tumor de Ehrlich ou tumor ascítico de Ehrlich são igualmente empregadas. Sendo assim, este tumor tem sido amplamente empregado em estudos fisiopatológicos associados aos efeitos sistêmicos comprometidos com a evolução temporal. Além disso, este tumor também oferece inúmeras vantagens como modelo tumoral experimental para a avaliação da atividade e mecanismo antitumoral de diferentes compostos. Entre as vantagens na utilização deste tumor pode-se citar sua inespecificidade frente a diferentes linhagens murinas e a facilidade de transplante com uma percentagem de 100% de crescimento. Desta forma, as células do TAE crescem rapidamente em qualquer linhagem de camundongos, podendo induzir tumores sólidos ou ascíticos que levam o hospedeiro à morte.

A influência do crescimento tumoral na proliferação das células pluripotentes do baço ou da medula óssea tem sido sugerida por inúmeros autores. O TAE produz alterações severas no sistema hematológico do hospedeiro e é freqüentemente associado com imunossupressão, anemia, trombocitopenia e leucocitose granulócito-dependente (DELMONTE, LIEBELT, LIEBELT, 1966; CLERICI *et al.*, 1971; LALA *et al.*, 1977; KEEB & LALA, 1978; WHITNEY, KELLY, LEVY, 1978; PESSINA *et al.*, 1982a; PESSINA *et al.*, 1982b; PARHAR & LALA, 1988; LALA *et al.*, 1990; BALDUCCI & HARDY, 1992; RUIZ DE MORALES, VÉLEZ, SUBIZA, 1999). PESSINA *et al.*, (1982a), observaram que o tratamento *in vitro* de células de medula óssea normais com fluido ascítico de Ehrlich acelular produz uma redução severa no número de colônias formadas a partir de células precursoras da medula óssea (CFU-C) e das células pluripotentes do baço. Além disso, vários trabalhos realizados em nosso laboratório, demonstraram que, em animais portadores de tumor ascítico de Ehrlich, ocorre uma mielossupressão, expressa através de uma redução no número de colônias de granulócitos e macrófagos (CFU-GM), formadas a partir de precursores hematopoéticos da medula óssea (VALADARES *et al.*, 1998; JUSTO, DÚRAN, QUEIROZ, 2001; JUSTO *et al.*, 2001). Outro aspecto importante deste tumor experimental, é a influência da produção de fatores humorais que afetam a atividade normal de macrófagos. Vários trabalhos na literatura sugerem que estas

alterações estão relacionadas a presença de fatores humorais lançados durante a evolução tumoral, como por exemplo, as prostaglandinas da série E₂ (PGE₂), fatores de crescimento tumoral (TGF-β), fatores de crescimento endotelial vascular (VEGF), fatores estimuladores de crescimento para granulócitos e macrófagos (GM-CSF) e à presença de células supressoras naturais. (SMITH & LEVINSON, 1979; VIÑUELA *et al.*, 1991; SEGURA *et al.*, 2000; SEGURA *et al.*, LUO *et al.*, 1998) Além disso, a presença da hematopoese esplênica, induzida pelo desenvolvimento tumoral, também tem despertado grande interesse da comunidade científica, pois ainda não foi possível definir se o baço é capaz de suportar a hematopoese extramedular ou se as células progenitoras verificadas neste órgão migram da medula óssea. Todas estas hipóteses estão representadas na figura 1 a seguir.

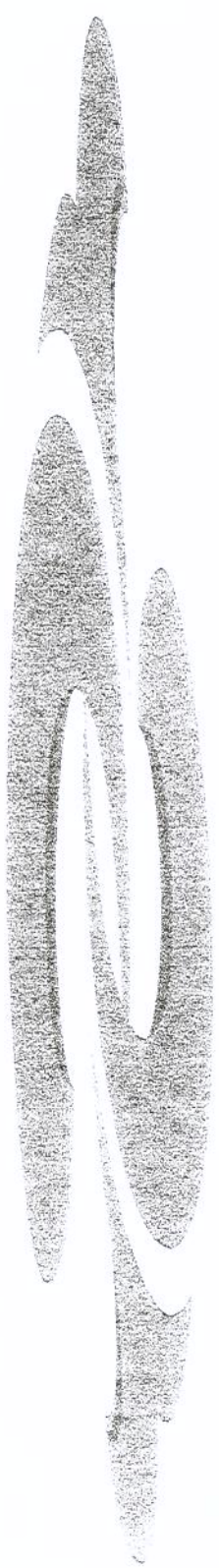


Portanto, o estudo de neoplasias em modelos animais facilita a avaliação e melhor compreensão da imunobiologia dos tumores, ao mesmo tempo que constitui instrumento apropriado para a investigação de efeitos imunomoduladores de substâncias com potencial antineoplásico.

Diante do exposto e das evidências de que a resposta do sistema hematopoético é de fundamental importância para a sobrevivência de animais portadores do TAE, neste trabalho avaliou-se os efeitos produzidos pela GR sobre o sistema hematopoético de camundongos portadores do TAE, através do estudo do crescimento e diferenciação dos precursores hematopoéticos da medula óssea (CFU-C). Esta avaliação foi realizada através da técnica de cultura clonal, descrita por METCALF (1984), pois estes ensaios clonogênicos em meio semi-sólido em ágar ou metilcelulose permitem avaliar o grau de diferenciação de cada célula progenitora e a identificação da morfologia das células pertencentes a cada colônia.

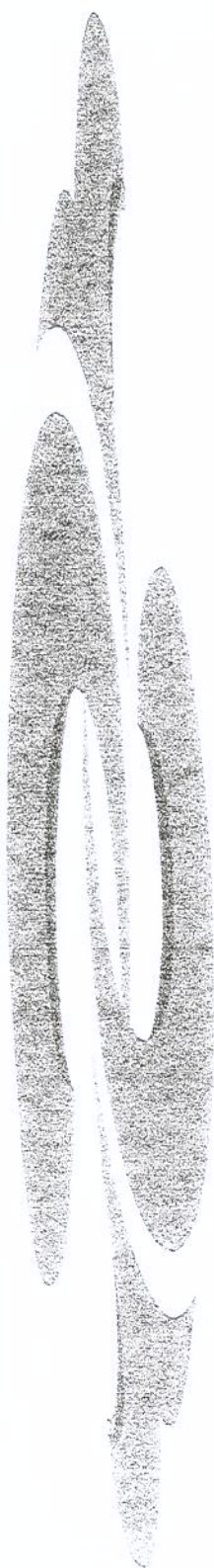
Diante do fato de que os testes clonogênicos em meio semi-sólido (CFU-C) não avaliam diretamente os efeitos provocados por uma substância química sobre as células estromais, avaliamos também os efeitos da GR sobre a formação do estroma medular, através da técnica de cultura líquida de longa duração. (DEXTER, ALLEN, LAJTHA, 1977; DEXTER, 1982; ALLEN & DEXTER, 1984). As células do estroma medular apresentam pelo menos quatro tipos celulares distintos (células endoteliais, células acumuladoras de lipídeos, macrófagos e células fibroblastóides) que regulam a maturação e diferenciação das células troco hematopoéticas pluripotenciais.

Esta regulação é mediada pelo contato direto entre as células hematopoéticas e células estromais, envolvendo moléculas de adesão (predominantemente colágeno e protoglucanas produzidas pelas células estromais), ou indiretamente através dos fatores de crescimento hematopoético. (GUEST & UETRECHT, 2001). Estes elementos surgem ao longo do cultivo de células totais de medula óssea, onde as células acumuladoras de lipídeos sinalizam o amadurecimento e competência deste sistema. Neste tipo de cultivo, a hematopoese é sustentada *in vitro* sem a adição de fatores de crescimento exógenos, sendo portanto totalmente dependente da síntese e liberação de fatores de crescimento hematopoéticos endógenos. Portanto, durante todo o período da manutenção da cultura, é possível avaliar a produção de células diferenciadas ou dos progenitores que se renovam durante o cultivo. Geralmente, pode-se dizer que o tempo do cultivo reflete o número de células tronco presentes ou a capacidade de auto-renovação destes progenitores.



2. OBJETIVOS

Diante das evidências de que a resposta hematopoética medular e extramedular estão envolvidas no desenvolvimento tumoral e da suposta atividade antineoplásica da GR, neste trabalho, utilizando dois sistemas de cultivo de células hematopoéticas, avaliou-se os efeitos da GR sobre o crescimento e diferenciação de precursores hematopoéticos da medula óssea e do baço de camundongos inoculados com células tumorais de Ehrlich e a formação do estroma medular de animais normais, na presença da GR, *in vitro*. Finalmente, investigou-se a sobrevida dos animais inoculados com as células do TAE e tratados com GR.



3.MATERIAL E MÉTODOS

3.1. GELÉIA REAL (GR):

As amostras de GR foram adquiridas em apiários ou entrepostos de comercialização de produtos apícolas. As amostras foram mantidas sob refrigeração a -18°C e ao abrigo da luz, desde o momento do recebimento até o momento do experimento.

3.1.1. Verificação da solubilidade da GR em meio alcalino para comprovação de sua pureza

Foi realizado um teste de solubilidade das amostras de GR a fim de se detectar possíveis adulterações que pudessem alterar os resultados deste estudo. Este teste foi realizado da seguinte forma:

A partir de uma tomada de ensaio da amostra (aproximadamente 1,0 g) foi dispersa em 20 mL de água destilada, resultando em turvação característica. Em seguida foi adicionada solução de hidróxido de sódio 20%, gota a gota, com agitação suave, até solubilização completa da amostra. A presença de turvação na mistura final, resulta presença de substâncias que possivelmente não pertencem à composição da GR (GARCIA-AMOEDO, 1999).

3.2. ANIMAIS E TRATAMENTO COM A GR:

Para a realização dos experimentos foram utilizados camundongos machos BALB-c com idade aproximada entre 6 a 8 semanas. Estes camundongos foram fornecidos pelo Biotério Central da UNICAMP. Os animais foram divididos em grupos e cada grupo foi submetido ao tratamento de acordo com o protocolo experimental, a saber: animais controle que receberam apenas água destilada; animais apenas pré tratados por vinte dias com três concentrações de GR (500, 1000 ou 1500 mg/kg); animais apenas inoculados com TAE; e animais pré tratados com 500, 1000 ou 1500 mg/kg de GR e inoculados com TAE, sendo mantido o tratamento com GR, por mais 3, 8 e 13 dias após a inoculação do TAE.

A administração da GR foi realizada via gavagem, utilizando-se água destilada como veículo de administração. Estes animais receberam um pré tratamento de vinte dias com as três concentrações de GR. No vigésimo dia de tratamento, estes animais foram inoculados com as células tumorais de Ehrlich (6×10^6 cél/animal) e o tratamento com a GR foi mantido por mais 3, 8 e 13 dias. Vinte e quatro horas após a última dose de GR, os animais foram sacrificados para a realização dos experimentos. A figura 2 a seguir, ilustra um esquema de maneira sucinta o protocolo de tratamento utilizado neste estudo.

PROTOCOLO PROFILÁTICO-TERAPÊUTICO

TRATAMENTO: Os animais receberam GR via oral (n=6, 500, 1000 e 1500 mg/kg/dia)

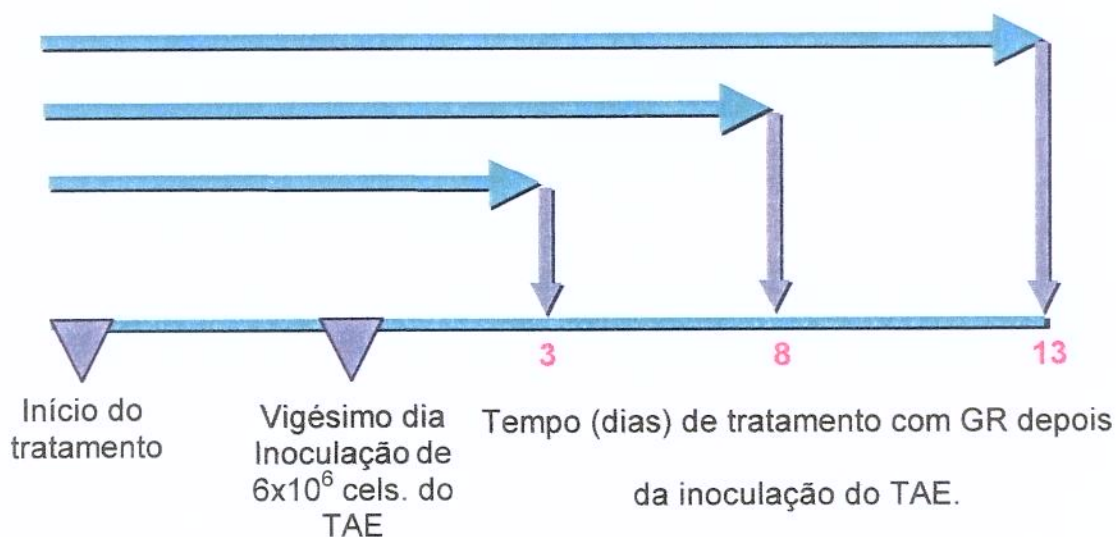


Figura 2: Esquema ilustrativo do protocolo profilático terapêutico.

3.3. OBTENÇÃO DO TUMOR ASCÍTICO DE EHRlich (TAE):

Essas células foram isoladas de camundongos machos BALB/c, portadores do tumor e mantidas através de passagens sucessivas e intraperitoneais entre animais.

As células tumorais de Erhlich crescem na cavidade peritoneal de camundongos e sua manutenção é feita através de passagens sucessivas. Para o desenvolvimento do TAE, os camundongos foram inoculados, i.p. com 0,2 mL de uma suspensão contendo 6×10^6 células tumorais, provenientes da cavidade peritoneal de camundongos portadores.

Após a retirada do líquido ascítico do peritônio de camundongos portadores, o número e a viabilidade das células foram determinados através da exclusão do corante azul-trypan, em câmara de câmara hemocitométrica.

3.4. CULTURA CLONAL DE PRECURSORES HEMATOPOÉTICOS (CFU-C) DA MEDULA ÓSSEA E DO BAÇO DE CAMUNDONGOS:

Para enumerar estas células clonogênicas é importante que todas as células multipotenciais presentes na cultura sejam induzidas a proliferar e que o número de células presentes seja ajustado, a fim de se evitar uma quantidade exagerada de colônias em cada placa de Petri, com conseqüente superposição das mesmas. Também é importante que o fator estimulador de colônias (CSF) seja utilizado em concentrações supramáximas. Além disso, a escolha do soro bovino fetal deve ser realizada cuidadosamente, devido a variações de atividade entre os vários lotes e marcas de soro (METCALF, 1984).

Após sacrificar o animal por deslocamento cervical, limpou-se a pele com álcool 70% e o fêmur foi exposto. A cartilagem sobre o orifício na extremidade distal foi removida e o osso foi cortado na junção superior. A medula óssea foi transferida com o auxílio de agulha e seringa para um tubo contendo 5 mL de meio de cultura RPMI-1640 (Sigma). O baço foi removido em condições assépticas e colocado em tubo estéril contendo 5 mL de meio RPMI. A seguir, o baço foi macerado cuidadosamente para liberação das células esplênicas. O número de células viáveis na suspensão foi contado em câmara hemocitométrica após diluição (1:10) em azul de Tripan.

Preparou-se a suspensão para a incubação das células em cultura, a qual consiste de: 30% de meio DMEM (Dulbecco's Modified Eagle's Medium-Difco) 2 x concentrado; 20% de soro bovino fetal e 50% de ágar (concentração final de 0,3 %) (Bacto-Ágar-Difco). A seguir, adicionou-se ao meio o volume apropriado de células, correspondente a 1×10^5 células/mL e 2×10^5 células/mL para a avaliação da mielopoiese medular e extramedular, respectivamente. Distribuíram-se volumes de 2 mL em cada placa de Petri (35 mm), já contendo 100 μ l do fator estimulador apropriado (0,1 mL de SCM), homogeneizou-se a placa com movimentos giratórios, permitindo uma maior distribuição por toda a superfície da placa de Petri. Deixou-se gelificar e incubou-se por 7 dias a 37 °C em presença de 5% de CO₂ no ar. Após este período contou-se o número de colônias formadas em microscópio de dissecção com aumento de 40 x. (METCALF, 1984).

Para estudo morfológico as colônias foram fixadas com glutaraldeído 2,5 % (v/v) e coradas com Luxol Fast Blue/hematoxilina. A figura 2 mostra o aspecto microscópico de uma colônia de células de granulócitos/macrófagos de animais normais, na presença de meio condicionado de células esplênicas (SCM).

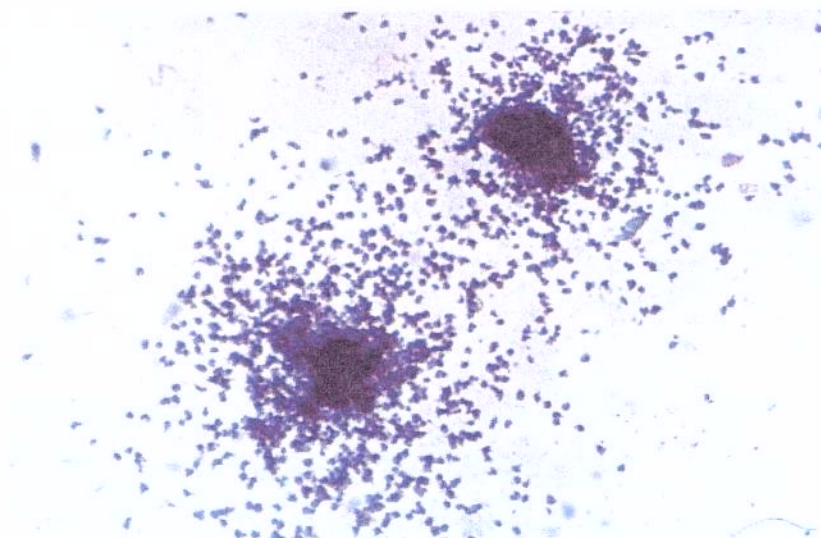


Figura 3: Fotomicrografia de uma colônia de células precursoras hematopoéticas da medula óssea

3.5. PESO DO BAÇO DOS ANIMAIS SUBMETIDOS AOS REFERIDOS TRATAMENTOS:

Após remoção do baço (como descrito item 3.4), seu peso foi mensurado em gramas para posterior análise.

3.6. PREPARAÇÃO DO MEIO CONDICIONADO DE CÉLULAS ESPLÊNICAS (SCM):

Baços de camundongos BALB/c foram removidos sob condições assépticas e passados delicadamente através de peneira de aço inoxidável estéril. Preparou-se uma suspensão com 2×10^6 células/mL em meio RPMI-1640 (Sigma) contendo 5 % de soro humano inativado, 5×10^{-5} M de 2-mercaptoetanol quais foram adicionados à suspensão celular e a cultura estimulada com *pokeweed mitogen* (Sigma) na proporção de 0,05 ml do mitógeno para 1 mL de meio. Após 7 dias de incubação a 37°C em estufa úmida contendo 5% de CO₂ no ar. A suspensão foi centrifugada e o sobrenadante filtrado em membrana de 0,22 µm (Milipore). A atividade funcional do SCM foi determinada através dos estímulos produzidos sobre o crescimento clonal de células progenitoras hematopoéticas de animais normais em meio semi-sólido. A titulação deste lote de SCM demonstrou que na diluição de até 1:4 fornece resultados que estão dentro dos níveis de resposta supermáxima. Os resultados, em duplicata, da titulação realizada em cultura de 7 dias estão apresentados na tabela 1 a seguir:

Tabela 1: Titulação do meio condicionado de células esplênicas (SCM) em presença de células de medula óssea de camundongos BALB/c (1×10^5 células/mL)

DILUIÇÃO SCM	CFU-C $\times 10^2$ #
1:1	109,2 \pm 4,2
1:2	102 \pm 3,5
1:4	105,6 \pm 5,1
1:8	75,6 \pm 4,2
1:16	57,6 \pm 4,0
1:32	34,8 \pm 3,0
1:64	7,2 \pm 1,2
1:168	0

#Número total de células por fêmur

Resultados obtidos em duplicata por diluição

3.7. OBTENÇÃO DO SORO DOS ANIMAIS PARA DETECÇÃO DA ATIVIDADE DOS FATORES ESTIMULADORES DE COLÔNIAS:

O sangue dos animais dos 3 grupos experimentais, grupo controle; animais somente pré tratados por vinte dias com 500 mg/kg de GR e animais pré tratados com 500 mg/kg de GR e inoculados com TAE, sendo mantido o tratamento com GR, por mais 8 dias após a inoculação do TAE. foi obtido através de punção do plexo ocular, sendo separado em “pools”, centrifugado para obtenção do soro, e este armazenado a -20°C . A produção dos fatores estimuladores de colônias do soro dos animais em questão, foi determinada através de sua capacidade promotora de crescimento e diferenciação de precursores hematopoéticos da medula óssea de animais normais.

Esta atividade estimuladora de colônias foi determinada a partir da curva de titulação do meio condicionado de células esplênicas (SCM), ilustrada na figura 3. De acordo com VAN DEN ENGH & BOL, (1975), a menor concentração capaz de estimular o crescimento de colônias é considerada como 1 unidade de CSF/mL.

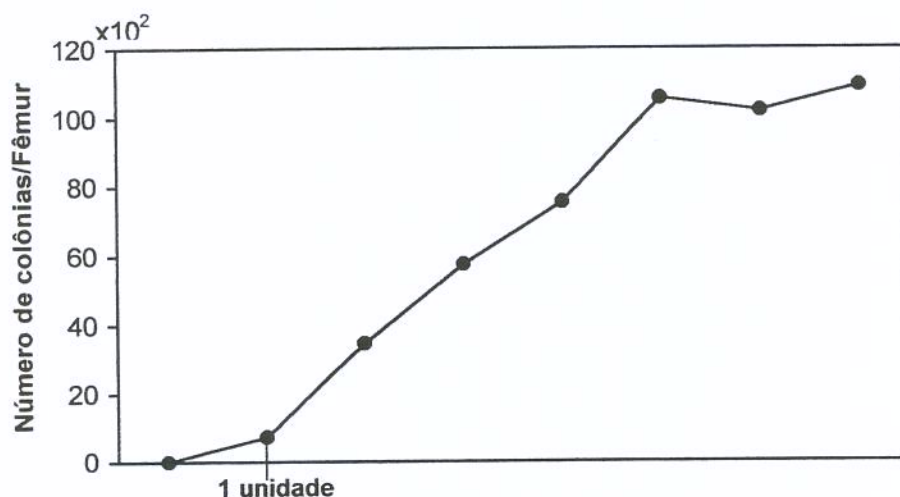


Figura 4: Capacidade estimuladora do crescimento de colônias do meio condicionado de células do baço (SCM) expressa em unidades por mL.

3.8. CONTAGEM DIFERENCIAL DE CÉLULAS DA MEDULA ÓSSEA:

Após remoção da medula óssea (como descrito no item 3.4), as células dos animais de cada grupo experimental (6 animais por grupo), foram transferidas para um tubo contendo 5 mL de meio RPMI-1640 (Sigma) e centrifugadas a 1500 rpm durante 10 minutos. Desprezou-se o sobrenadante e o “pool” de células de cada grupo foi ressuspense em 2 mL de meio RPMI-1640 (Sigma). A seguir, 500 µl desta suspensão foram utilizados para a realização do citospin (800 rpm durante 5 minutos). As lâminas foram coradas com Leishman e a leitura foi realizada em objetiva de 40x.

3.9. CULTURA LÍQUIDA DE LONGA DURAÇÃO (LTBMC) DAS CÉLULAS DO ESTROMA MEDULAR DE ANIMAIS NORMAIS:

Após sacrificar o animal por deslocamento cervical, limpou-se a pele com álcool 70% e os fêmures foram expostos. A cartilagem sobre o orifício na extremidade distal foi removida e o osso foi cortado na junção superior. As células do estroma medular (aproximadamente 10^7 células/mL) foram removidas e transferidas com o auxílio de agulha e seringa para um tubo contendo 10 mL de meio de cultura RPMI-1640 (Sigma) completo, o qual continha: 20 % de soro Equino (Sigma) e 1% de uma solução de hidrocortisona (10^{-4} M) e 100 ou 500 mg/L de GR, tendo um grupo de garrafas controle que não recebeu tratamento com GR. Esta suspensão de células foi transferida para garrafas de cultura (25 mL) tendo 5 garrafas de cultura para cada grupo. Estas foram incubadas por 3 semanas a 37 °C na presença de 5% de CO₂. Uma vez por semana estas células foram alimentadas através da remoção de 50% do meio saturado e adição do mesmo volume de meio RPMI completo.

Após a terceira semana (tempo necessário para confluência das células estromais), ao fazer a troca do meio estas culturas foram repovoadas com células da medula óssea de animais normais (aproximadamente 10^7 células por mL). Este repovoamento celular é necessário para que as células hematopoéticas mais imaturas possam agora se alojar na capa de células aderentes e iniciar a hematopoese *in vitro*.

A introdução da GR ocorreu na 4ª semana de incubação, onde o estroma medular já estava confluyente e as culturas já repovoadas, e a partir da quinta semana iniciam-se os ensaios de CFU-C e a contagem da celularidade do sobrenadante destas culturas.

3.9.1. Cultura clonal de precursores hematopoéticos (CFU-C) *in vitro* a partir do sobrenadante da cultura líquida de longa duração:

A partir da quinta semana de cultivo, a cada sete dias, foram coletados 5 mL do meio de cultura. A seguir, este foi centrifugado (10 min. a 1500 rpm), e o “pellet” foi resuspenso em 2 mL de meio RPMI. Após a contagem do número de células viáveis em câmara hemocitométrica, estas foram então submetidas ao mesmo protocolo de cultura clonal de precursores hematopoéticos descrito no item 3.4.

A figura 5 mostra o aspecto microscópico da capa aderente de células do estroma medular de animais normais e o aspecto de uma colônia de células (CFU-C), obtida a partir do sobrenadante desta cultura.

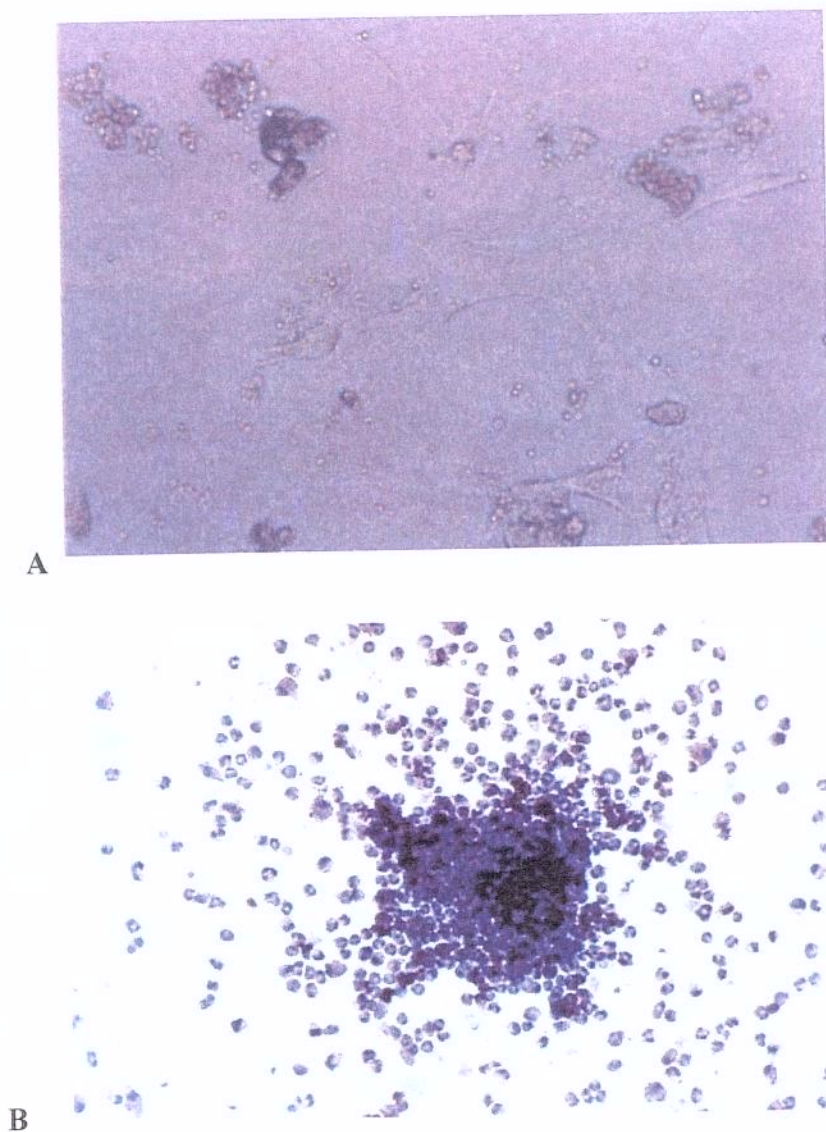


Figura 5: A) Fotomicrografia de células aderentes do estroma medular de camundongos BALB-c e

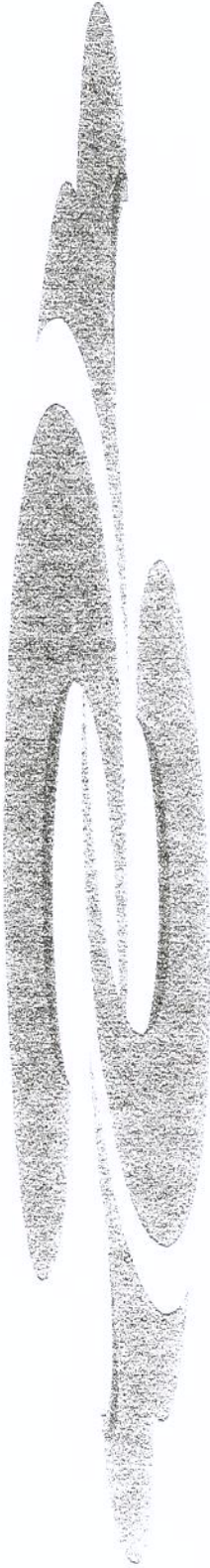
B) Fotomicrografia de uma colônia de células progenitoras (CFU-C), obtida pela estimulação *in vitro* das células do sobrenadante desta cultura.

3.10. CURVA DE SOBREVIDA:

A fim de observar uma possível proteção dos animais tratados com a GR, realizou-se a curva de sobrevivência. Considerou-se 4 grupos experimentais: animais inoculados com TAE (6×10^6 células/animal); animais apenas pré tratados por vinte dias com 500, 1000 ou 1500 mg/kg de GR e animais pré tratados com as três concentrações de GR, sendo no vigésimo dia de tratamento inoculados com TAE, sendo mantido o tratamento com GR, por mais 8 dias após a inoculação do TAE.

3.11. ANÁLISE ESTATÍSTICA:

A análise de variância ANOVA foi utilizada para avaliar diferenças entre CFU-C/fêmur; CFU-C/baço; fatores estimuladores de colônias e peso dos baços. A comparação entre os grupos foi realizada pelo teste de Tukey. Para se avaliar a sobrevivência dos animais portadores do TAE e tratados com GR, utilizou-se a curva de Log-rank, procedimentos não paramétricos. Em todos os grupos estudados, considerou-se estatisticamente significativos aqueles que possuíam $P < 0,05$.



4. RESULTADOS

4.1. EFEITOS DA GR SOBRE O NÚMERO DE PERCURSOES HEMATOPOÉTICOS DA MEDULA ÓSSEA E BAÇO DE CAMUNDONGOS (CFU-C):

4.1.1. Medula óssea:

Estes resultados estão apresentados na figura 6; tabelas 3, 4 e 5 (apêndice). A mielossupressão verificada nos camundongos inoculados com o TAE foi expressa através de uma diminuição do número de células formadoras de colônias (CFU-C), as quais foram identificadas como colônias de granulócitos e macrófagos (CFU-GM), quando comparado ao controle, em todos os períodos de estudo ($P < 0.05$ ANOVA, Teste de Tukey). Entretanto, quando os animais portadores do TAE receberam um tratamento profilático/terapêutico com as três doses de GR (500, 1000 e 1500 mg/kg), todos os grupos apresentaram um aumento significativo no número de CFU-GM em relação aos animais portadores do TAE, não tratados com GR. Além disso, oito dias após a inoculação tumoral, a dose de 500 mg/kg foi capaz de prevenir totalmente a mielossupressão induzida pelo TAE, pois o número de CFU-GM neste grupo foi similar ao controle normal. As doses maiores também foram capazes de reverter a mielossupressão induzida pelo TAE, porém este efeito foi verificado apenas no décimo terceiro dia após a inoculação tumoral. É interessante observarmos que no décimo terceiro após a inoculação tumoral, os animais tratados com 500 mg/kg apresentaram um aumento ainda mais significativo no número de CFU-GM, o qual foi superior em relação aos animais normais (sem tratamento). ($P < 0.05$; ANOVA, teste de Tukey).

A administração das três doses da GR, em animais normais, não alterou o número de CFU-GM da medula óssea.

4.1.2. Baço:

Estes resultados estão apresentados na figura 7; tabelas 6, 7 e 8 (apêndice).

O número de CFU-GM no baço de animais portadores do TAE apresentou-se dramaticamente aumentado em relação ao controle normal em todos os grupos avaliados, deixando evidente que a hematopoese extramedular está associada ao crescimento tumoral.

($P < 0.05$ ANOVA, Teste de Tukey). Entretanto, quando os animais foram tratados com 500 e 1000 mg/kg de GR, a hematopoese extramedular foi totalmente prevenida durante todo o período de estudo. Porém, a dose de 1500 mg/kg foi capaz de prevenir parcialmente a presença da hematopoese extramedular, pois no décimo terceiro dia de tratamento com a GR, o grupo apresentou um número de CFU-GM aumentado em relação ao controle e reduzido em relação ao grupo portador do TAE, sem tratamento com a GR ($P < 0.05$ ANOVA, Teste de Tukey).

Ao se avaliar a hematopoese extramedular no baço de animais tratados com GR, verificamos que não houve alteração no número de CFU-GM.

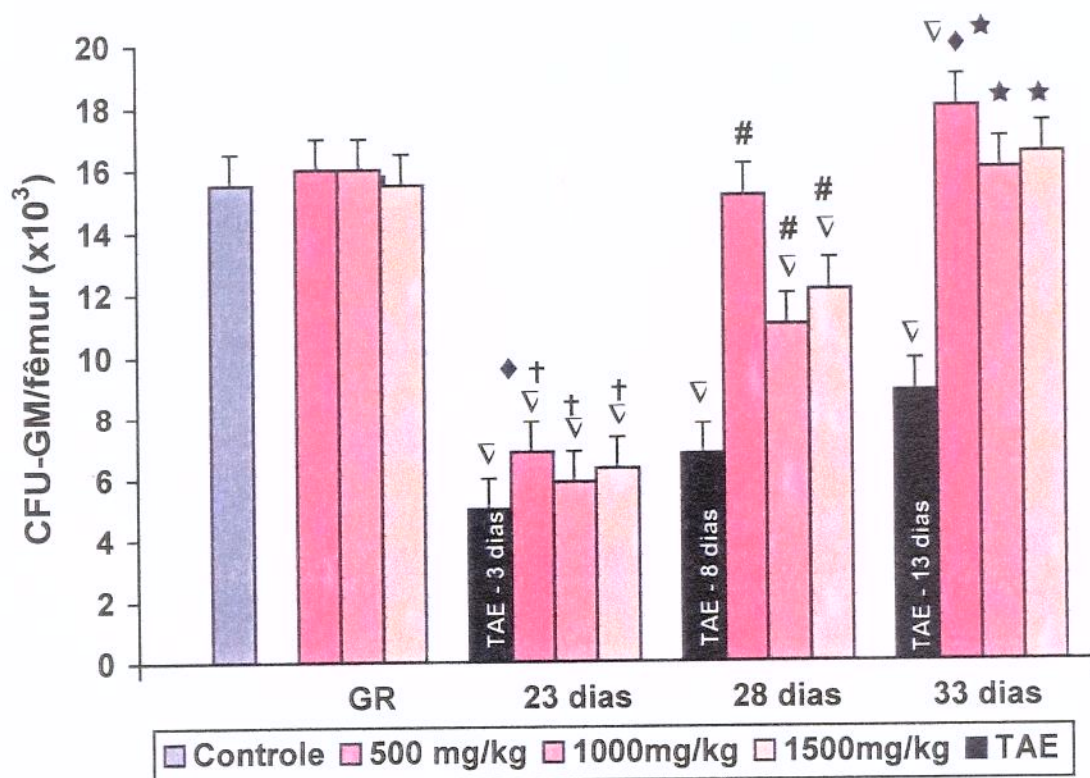


Figura 6: Efeitos da GR (500, 1000 e 1500 mg/kg) sobre o crescimento e diferenciação de precursores hematopoéticos da medula óssea de camundongos BALB-c portadores do TAE.

UNICAMP
BIBLIOTECA CENTRAL
SEÇÃO CIRCULANTE

No vigésimo dia de tratamento com GR, os animais foram inoculados com as células tumorais (6×10^6 cel./animal - i.p.), e a administração da GR foi mantida por mais 3, 8 e 13 dias. ($n = 6$, $P < 0,05$ ANOVA, Teste de Tukey). ∇ significativo em relação ao controle; \dagger significativo em relação ao TAE/3 dias; $\#$ significativo em relação ao TAE/8 dias; \star significativo em relação ao TAE/13 dias; \blacklozenge significativo em relação às doses de 1000 e 1500 mg/kg.

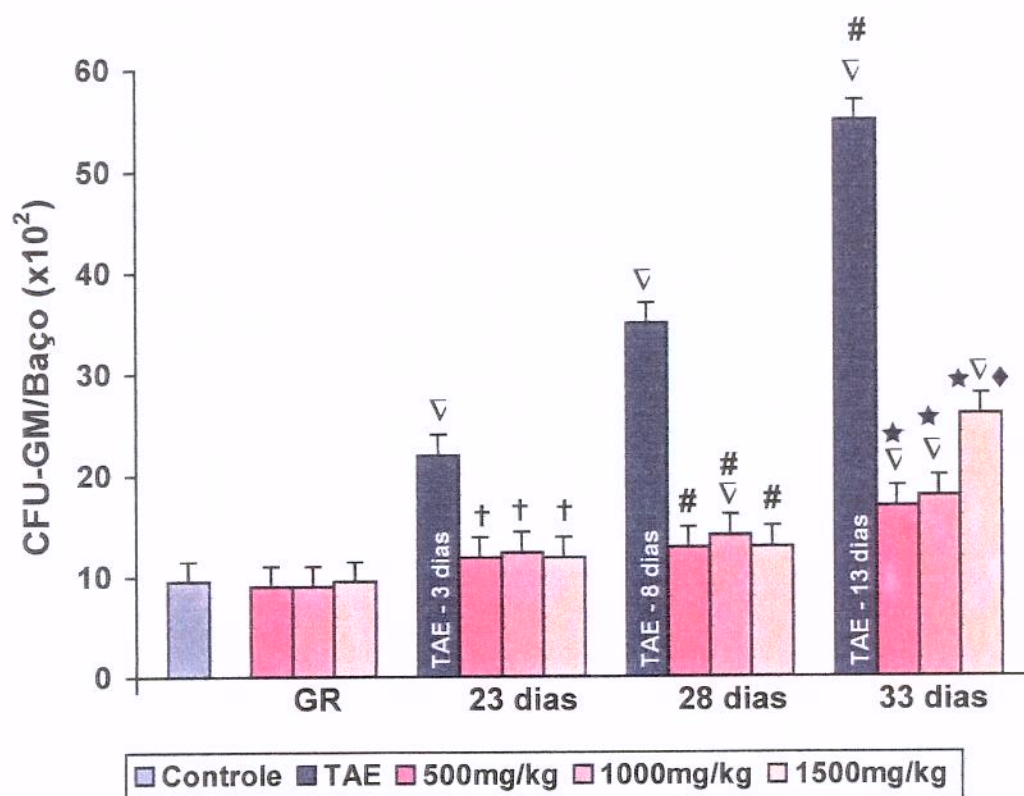


Figura 7: Efeitos da GR (500, 1000 e 1500 mg/kg) sobre o crescimento e diferenciação de precursores hematopoéticos do baço de camundongos BALB-c portadores do TAE.

No vigésimo dia de tratamento com GR, os animais foram inoculados com as células tumorais (6×10^6 cel./animal - i.p.), e a administração da GR foi mantida por mais 3, 8 e 13 dias. (n= 6, $P < 0,05$ ANOVA, Teste de Tukey). ∇ significativo em relação ao controle ; = significativo em relação ao TAE/3 dias; # significativo em relação ao TAE/8 dias; H significativo em relação ao TAE/13 dias; \blacklozenge significativo em relação às doses de 1000 e 1500 mg/kg;

4.2. EFEITOS DA GR SOBRE O PESO DO BAÇO:

Os resultados obtidos nesta avaliação estão apresentados nas tabelas 9, 10 e 11 (apêndice). A ausência de efeitos da GR sobre o baço de animais normais foi mais uma vez confirmada quando se analisou o peso deste órgão, pois foram obtidos resultados similares entre o controle normal e tratado. Por outro lado, os animais inoculados com o TAE há 3 e 8 dias, apresentaram um aumento significativo deste órgão, em relação ao controle (n=6, $P < 0,001$ ANOVA, Teste de Tukey). Este aumento foi ainda mais evidente em animais portadores do TAE com 13 dias, quando comparado ao controle normal (n=6, $P < 0,001$ ANOVA, Teste de Tukey). O tratamento com a GR não foi capaz de prevenir o aumento do baço nos animais portadores do TAE.

4.3. EFEITOS DA GR SOBRE A PRODUÇÃO DE FATORES ESTIMULADORES DE COLÔNIAS:

Estes resultados estão apresentados na figura 8; tabela 12. (apêndice).

O efeito promotor do crescimento e diferenciação dos precursores hematopoéticos foi avaliado, em cultura contendo células precursoras de animais normais e utilizando-se o soro de animais tratados com GR como fator estimulador de crescimento hematopoético.

Verificou-se, neste estudo, que a presença do TAE induziu um aumento nos níveis de fatores estimuladores de colônias (CSFs) do soro destes animais, em relação ao controle normal, ($P < 0,05$ ANOVA, Teste de Tukey). Este aumento nos níveis de

CSFs foi parcialmente prevenido no grupo de animais inoculados com células do TAE e tratados com GR (500 mg/kg), pois os níveis destes fatores apresentaram-se aumentados em relação ao controle, mas diminuídos quando comparado ao grupo apenas portador do TAE ($P < 0,05$ ANOVA, Teste de Tukey).

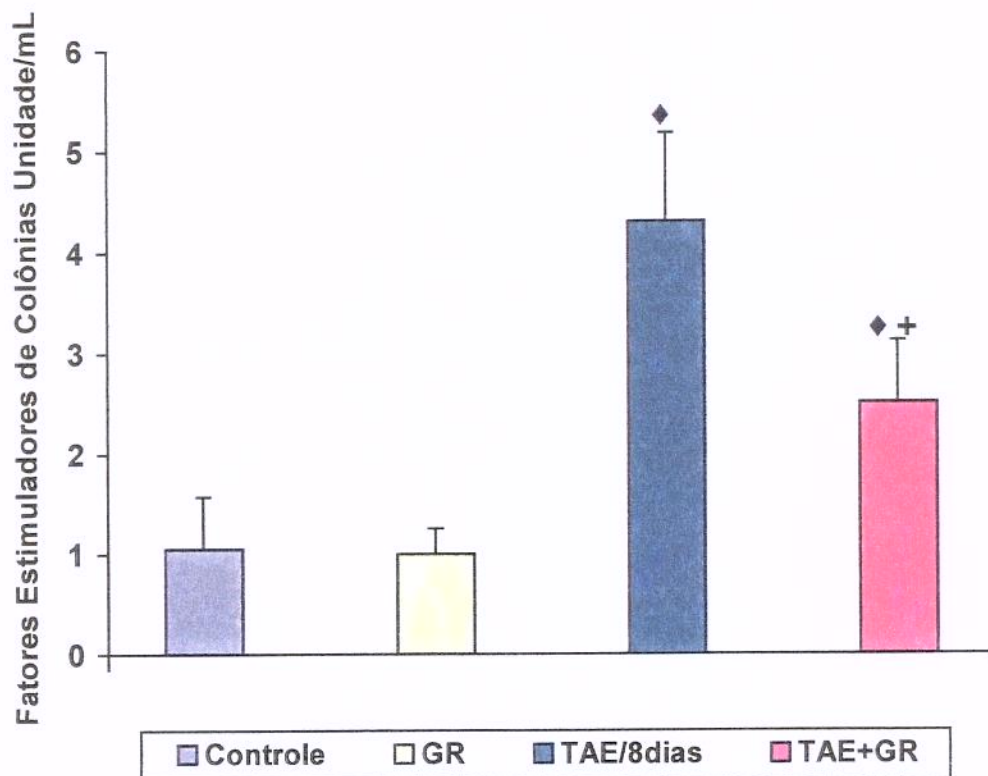


Figura 8: Atividade estimuladora de colônias do soro de camundongos BALB-c inoculados com TAE e tratados com 500 mg/kg de GR.

No vigésimo dia de tratamento com GR, os animais foram inoculados com as células tumorais (6×10^6 cél./animal - i.p.), e a administração da GR foi mantida por mais 8 dias. ($n = 6$, $P < 0,05$ ANOVA, Teste Tukey). ♦ Significativo em relação ao controle; + Significativo em relação ao TAE/8 dias.

4.4. EFEITOS DA GR SOBRE A CONTAGEM DIFERENCIAL DE CÉLULAS DA MEDULA ÓSSEA:

Os resultados obtidos nesta avaliação estão apresentados na tabela 2. Como se pôde observar, nesta tabela, em camundongos normais a maior parte da população de células da medula óssea é composta por células maduras como neutrófilos polimorfonucleares (69%) e linfócitos (16%), seguida por promielócitos/mielócitos (12%) e mieloblastos (3%). O tratamento com a GR não alterou estes valores. Nos grupos portadores do TAE, observou-se um aumento de promielócitos/mielócitos de 15 % para 28, 29 e 28 % e uma diminuição de neutrófilos PMN de 65 % para 45, 40 e 15 % com 3, 8 e 13 dias, respectivamente, em relação ao controle.

A celularidade do grupo de camundongos inoculados com células tumorais e tratados com GR foi similar ao grupo apenas portador do TAE, nos três períodos estudados.

Tabela 2: Efeitos da GR sobre a contagem diferencial de células da medula óssea de camundongos BALB/c pré tratados por 20 dias com GR (500 mg/kg) e inoculados com TAE (6×10^6 cel./animal - i.p.) o tratamento com GR foi mantido por mais 8 dias após a inoculação tumoral.

Contagem diferencial de células da medula óssea									
	Mieloblasto		Promielócito e Mielócito		Neutrófilo PMN e Metamielócito		Linfócito		
	%	Células 10^5	%	Células 10^5	%	Células 10^5	%	Células 10^5	Celularidade total
CONTROLE	2,30	3,22	15,00	21,00	65,30	91,49	17,35	24,29	14,80
GR	1,50	2,55	17,00	29,90	65,00	110,50	16,53	28,05	19,40
TAE 3°	7,50	9,38	28,00	35,00	45,52	56,88	19,00	23,75	12,50
TAE 8°	8,00	8,40	29,00	30,45	40,00	42,00	23,00	24,15	10,40
TAE 13°	8,00	8,00	28,00	28,00	45,00	45,00	19,00	19,00	10,00
TAE 3°/ GR	8,00	10,24	33,00	42,24	41,00	52,48	18,00	23,04	12,70
TAE 8°/ GR	8,00	8,64	26,00	28,08	49,00	52,92	17,00	18,36	10,70
TAE 13°/ GR	8,00	8,00	26,00	28,01	49,00	52,00	17,00	18,06	10,00

CTRL: controle

GR: animais tratados por via oral com GR (500 mg/kg)

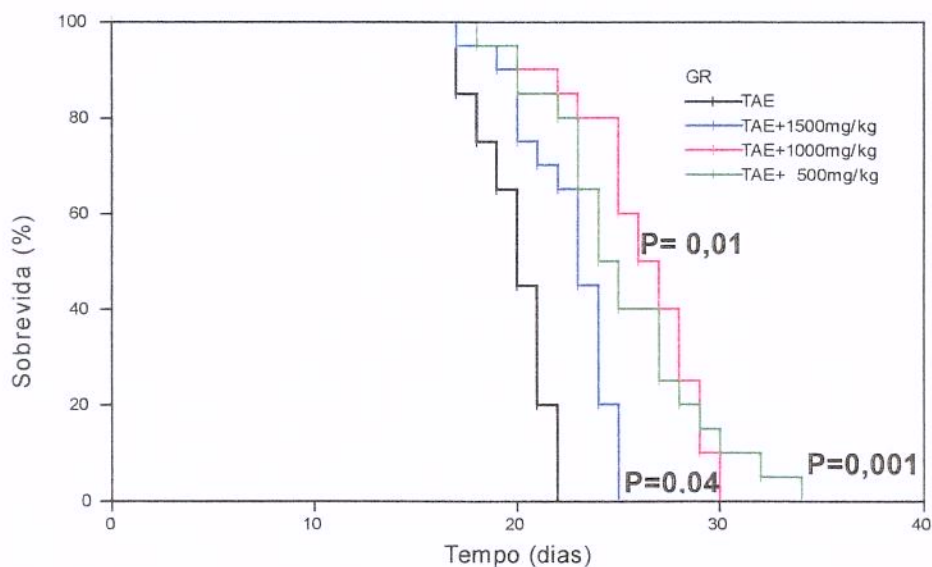
TAE: animais apenas portadores do TAE

TAE/GR: animais portadores do TAE e tratados com GR

4.5. EFEITOS DA GR NA SOBREVIDA DE ANIMAIS INOCULADOS COM TAE:

Os resultados obtidos nesta avaliação estão apresentados na figura 9. Nesta figura, pode-se observar que os animais apenas inoculados com células tumorais apresentaram uma mortalidade de 100%, sendo que a primeira morte ocorreu no décimo oitavo dia e as demais, gradativamente até o vigésimo segundo dia de inoculação tumoral. O tratamento prévio dos camundongos com a GR por vinte dias consecutivos antes da inoculação tumoral e oito dias após este procedimento, modificou a resistência dos mesmos ao TAE, pois o grupo tratado com 500mg/kg começou a morrer no décimo oitavo dia depois da inoculação tumoral, sendo que 100 % de mortalidade foi observada apenas no trigésimo quarto dia após a inoculação tumoral, resultando em um aumento de 27,5 % na sobrevida deste grupo ($P = 0,001$ – Curva de Kaplan-Meier, Log-rank).

As doses maiores da GR foram menos eficazes, porém, também foram capazes de aumentar a sobrevida dos animais portadores do TAE, quando comparadas ao controle (portadores do TAE/sem tratamento). Um aumento de 14,5 % e 10 % foi observada na sobrevida do grupo tratado com a dose de 1000 e 1500 mg/kg/dia, respectivamente ($P = 0,01$ – Curva de Kaplan-Meier, Log-rank).



No vigésimo dia de pré tratamento com a GR, os animais foram inoculados com as células tumorais e o tratamento foi mantido por mais 8 dias ($n=20$, $P<0,05$, Curva de Log rank).

4.6. EFEITOS DA GR *in vitro* SOBRE O ESTROMA MEDULAR DE CAMUNDONGOS BALB/C EM CULTURA LÍQUIDA DE LONGA DURAÇÃO:

Os resultados obtidos nesta avaliação estão apresentados nas figuras 10 A e B; tabela 13 (Apêndice). Pode-se observar, que a suplementação do meio de cultura com GR, estimulou as células do estroma medular de animais normais, pois verificou-se um aumento significativo na celularidade do sobrenadante da cultura de longa duração das células precursoras hematopoéticas quando estas foram incubadas com 100 e 500 mg/L de GR, em relação aos controles (células do estroma medular de animais sem tratamento), (figura 10 A, $n = 5$, $P< 0.05$ ANOVA, Teste de Tukey). Este aumento na celularidade do sobrenadante das culturas em relação aquelas sem GR foi verificado na 5^a, 6^a, 7^a e 8^a semanas após o início do cultivo. Porém, na 9^a e 10^a semanas, a celularidade apresentou-se similar ao controle (células cultivadas sem GR). Além disso, as culturas suplementadas com a GR (100 e 500 mg/L) apresentaram um maior número de CFU-C no período entre a 7^a e 10^a semanas, quando comparado às células sem tratamento, (figura 10 B, $n = 5$, $P< 0.05$ ANOVA, Teste de Tukey). É interessante observarmos que na 9^a e 10^a semanas, mesmo com celularidade similar ao controle, as células tratadas com GR apresentaram um maior número de CFU-C em relação aquelas sem tratamento (figura 10 B, $n = 5$, $P< 0.05$ ANOVA, Teste de Tukey), o que sugere um efeito da GR sobre o potencial de auto-renovação das células progenitoras.

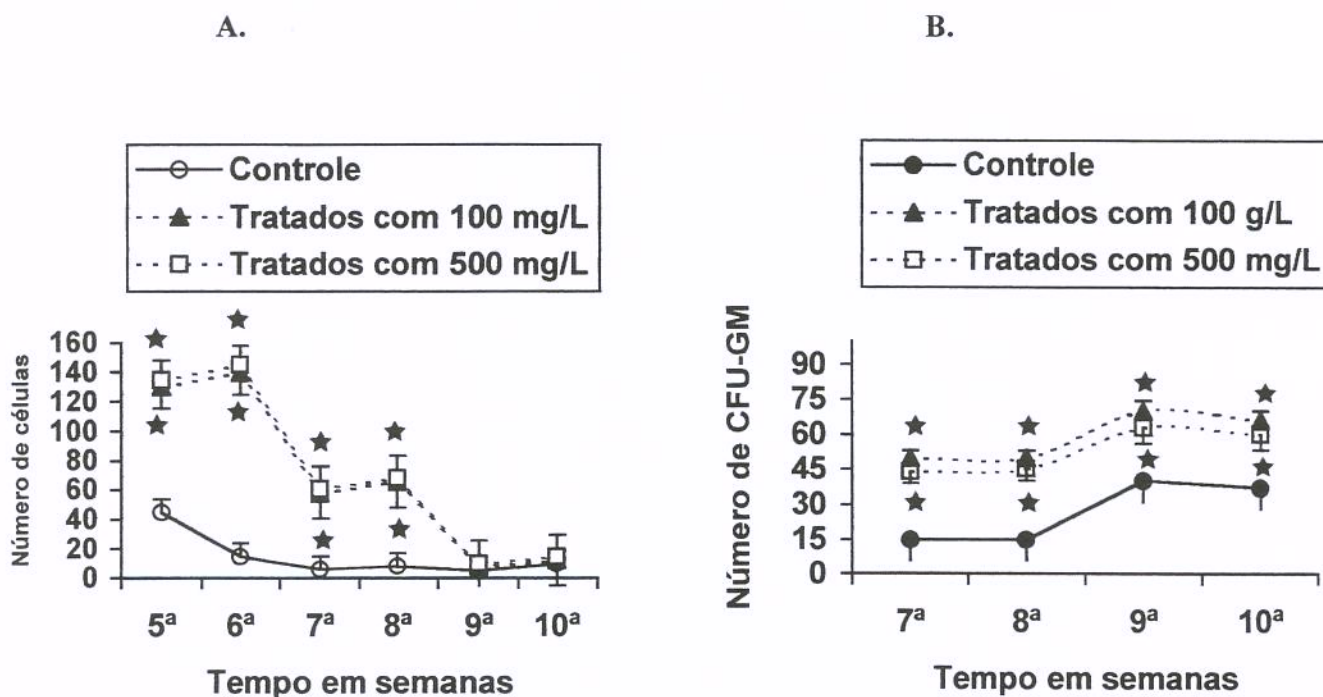


Figura 10: A) Efeitos da GR (100 ou 500 mg/L) sobre a celularidade do sobrenadante da cultura de longa duração do estroma medular de animais normais *in vitro*. (n = 5, P < 0.05 - ANOVA, Teste Tukey).

B) Efeitos da GR (100 ou 500 mg/L) sobre o número de células formadoras de colônias (CFU-C) obtido no sobrenadante da cultura líquida de longa duração do estroma medular de animais normais *in vitro*. (n = 5, P < 0,05 - ANOVA, Teste Tukey).

★ Significativo em relação ao controle.



5. DISCUSSÃO

A reposta hematopoética é fundamental para a manutenção da homeostase do organismo. Vários trabalhos têm demonstrado que a presença de tumores, tanto em humanos assim como em animais, resulta em um declínio na resposta hematopoética e imune do hospedeiro (RUSZALA-MALLON *et al.*, 1991; TAKAHASHI *et al.*, 1992). Desta forma, a avaliação dos efeitos produzidos por certos tumores, em sistemas experimentais, facilita a compreensão dos mecanismos de escape do tumor e contribui para o desenvolvimento de novos fármacos com potencial antineoplásico.

Neste sentido, neste trabalho verificou-se que o TAE induz uma mielossupressão, a qual foi expressa através de uma diminuição no número de colônias para granulócitos e macrófagos (CFU-GM). Além disso a presença deste tumor é capaz de induzir à hematopoese extramedular, a qual foi manifestada através de um aumento no número de precursores hematopoéticos no baço dos animais portadores do TAE. Estes resultados corroboram vários trabalhos descritos na literatura (PESSINA *et al.*, 1982a; HARDY & BALDUCCI, 1985; PARHAR & LALA, 1988; PARKER & PRAGNELL, 1995; LALA *et al.*, 1977) e realizados no laboratório (VALADARES *et al.*, 1998; JUSTO *et al.*, 2000; JUSTO *et al.*, 2001; QUEIROZ *et al.*, 2001) os quais tentam elucidar os mecanismos envolvidos na evolução tumoral.

Vários trabalhos na literatura têm demonstrado que o TAE também é capaz de induzir a liberação de substâncias inibitórias do sistema imune, como a prostaglandina da série E_2 – PGE_2 (FECCHIO *et al.*, 1990a; FECCHIO *et al.*, 1990 b), a qual parece contribuir para a mielossupressão induzida pelo TAE. Na presença de PGE_2 tem-se a inibição do influxo inflamatório e alterações das funções de macrófagos com inibição da proliferação de células T e bloqueio da ação de $TNF-\alpha$ nos macrófagos (YOUNG & HOOVER, 1986; NELSON *et al.*, 1990; ALLEVA, BURGER, ELGERT, 1993; SEGURA, BARBERO, MÁRQUEZ, 1997). Este autacóide também favorece a secreção de citocinas do tipo Th2 pela inibição das citocinas associadas à sub-série Th1, IL-2 e INF-gama (BETZ & FOX, 1991., HILKENS *et al.*, 1995). O papel da PGE_2 no desenvolvimento tumoral tem sido também proposto por YAMAMOTO *et al.*, (1995) em estudos demonstrando que inibidores da produção de PGE_2 são capazes de interferir no crescimento do tumor. Neste sentido, a GR tem a capacidade de diminuir a exudação e formação de colágeno em tecidos

granulativos, resultando em um efeito antiinflamatório significativo (FUJII *et al.*, 1990). Diante do fato de que agentes antiinflamatórios apresentam como mecanismo de ação uma inibição na produção de prostaglandinas por uma interferência na via da cicloxigenase, podemos sugerir que a ação antiinflamatória da GR, descrita na literatura, pode estar associada a uma possível diminuição na produção de eicosanóides como PGE₂, o que provavelmente pode contribuir para o aumento da sobrevivência de animais portadores do TAE e tratados com GR, conforme observado neste estudo.

Além deste aumento na produção de PGE₂ pelos macrófagos na presença do TAE, o envolvimento de fatores estimuladores de colônias para granulócitos/macrófagos (GM-CSF) e para granulócitos (G-CSF) (LI *et al.*, 1986; FU *et al.*, 1990; BALDUCCI & HARDY, 1992; YUONG & WRIGHT, 1992; ADACHI, *et al.*, 1994; RUIZ DE MORALES *et al.*, 1999), também tem sido relatado na literatura. Segundo WALKER *et al.*, (1994) os fatores estimuladores de colônias podem agir tanto de maneira autócrina, estimulando o próprio desenvolvimento tumoral, assim como, de maneira parácrina, estimulando a proliferação de células supressoras, as quais podem ser responsáveis pela imunossupressão induzida pelo TAE.

É interessante observar que o tratamento profilático/terapêutico com doses de 500, 1000 ou 1500 mg/kg de GR não alterou o número de CFU-GM da medula óssea e baço dos animais normais. Entretanto, quando os animais portadores do TAE foram previamente tratados com a GR, a mielossupressão induzida pelo TAE foi totalmente revertida a partir do oitavo dia após a inoculação tumoral, pois o número de CFU-GM apresentou-se próximo ao observado no controle normal. Além disso, a dose de 500 mg/kg foi ainda capaz de aumentar significativamente o número de colônias de células precursoras hematopoéticas em relação ao observado no controle normal, sugerindo um efeito estimulatório da GR sobre as células formadoras do estroma medular, as quais são responsáveis pela produção de precursores hematopoéticos. Este possível efeito da GR sobre o tecido medular foi confirmado com os resultados obtidos com o estudo dos efeitos da GR sobre a formação do estroma medular em animais normais, *in vitro*, os quais, corroboram os resultados obtidos *in vivo*, sugerindo portanto, que a GR estimula a produção de fatores estimuladores de colônias e/ou citocinas, resultando em um aumento na celularidade e no número de precursores hematopoéticos para granulócitos e macrófagos.

Este resultado, pode ser explicado, pelo menos em parte, pela presença das neopterinas na composição da GR. Segundo AIZAWA *et al.*, (1998), estas substâncias são capazes de estimular a produção de GM-CSF e IL-6 diretamente no microambiente das células estromais, o que pode explicar os resultados estimulatórios obtidos com a GR na cultura de longa duração das células precursoras hematopoéticas. O papel da IL-6 nas culturas de longa duração está bem definido na literatura. Segundo HAUSER *et al.*, (1997), a IL-6 é essencial na formação e função da atividade hematopoética, pois, culturas com anticorpo anti-IL-6 apresentam deficiência para suportar a hematopoese *in vitro*. Portanto, é possível sugerir que a presença das neopterinas na GR seriam responsáveis pela maior produção de IL-6.

A presença da hematopoese extramedular também foi totalmente inibida em animais portadores do TAE e tratados com GR, pois o número de CFU-GM foi significativamente menor em relação ao grupo apenas portador do tumor. Vários trabalhos tentam elucidar o papel da hematopoese extramedular durante a evolução tumoral (TOMIDA, YAMAMOTO-YAMAGUCHI, HOZUMI, 1984; RUIZ DE MORALES *et al.*, 1999). Evidências na literatura sugerem que a elevação no número de CFU-GM no baço de animais portadores do TAE, observado neste estudo, é secundária à presença do tumor. Um dos aspectos mais interessantes da influência do tumor na ascite maligna é o comprometimento agressivo dos fatores tumorais, que estimulam a proliferação de populações celulares distintas do baço, responsáveis pela produção de fatores imunossupressores (KEEB & LALA, 1978; PESSINA *et al.*, 1982 a; MCINTOSH & THOMSON, 1984; ELGERT, ALLEVA, MULLINS, 1998). Segundo TOMIDA *et al.*, (1984), fatores liberados pelas células tumorais de Ehrlich induzem a proliferação de células esplênicas com alterações fenotípicas e funcionais, o que é compatível com a presença de uma população aumentada de macrófagos supressores no baço de camundongos portadores do TAE, associada a uma atividade mielopoética (PARHAR & LALA, 1988; SUBIZA *et al.*, 1987;). Além disso, o crescimento tumoral estaria associado também a um aumento na atividade de células supressoras naturais (BONTA & BENEFRAIM, 1993; YAMAMOTO *et al.*, 1995). Portanto, a diminuição da atividade hematopoética no baço, induzida pela GR, também sugere uma diminuição na produção de células esplênicas com atividade supressora, com conseqüente normalização do número de precursores hematopoéticos no baço.

Uma possível ação da GR sobre a liberação de fatores humorais envolvidos na hematopoese esplênica e medular foi mais uma vez verificada quando se avalia a produção de fatores estimuladores de colônias em animais apenas portadores do TAE e portadores do TAE/tratados com GR, pois verificou-se que o soro dos animais do primeiro grupo é capaz de estimular a formação de colônias de precursores hematopoéticos de animais normais *in vitro*. Porém, quando estes animais são previamente tratados com GR, esta produção é parcialmente reduzida. Diante destes resultados, pode-se sugerir que a GR pode ser considerada uma substância modificadora da resposta biológica, sendo que este efeito imunomodulador contribui para aumentar a sobrevida dos animais portadores do TAE.

Novos estudos sobre os efeitos da GR sobre o sistema hematopoético são necessários, uma vez que este complemento alimentar pode agir como adjuvante da quimioterapia, contribuindo para o restabelecimento da medula óssea e ao mesmo tempo, retardando o desenvolvimento tumoral.



6. CONCLUSÕES

Este estudo sobre os efeitos da GR (500, 1000 ou 1500 mg/kg) sobre a resposta hematopoética demonstrou:

Estudos *in vivo*:

A administração das três doses de GR reverteu a mielossupressão induzida pelo TAE com as três doses estudadas, sendo que a dose de 500 mg/kg foi mais efetiva, pois esta concentração aumentou o número de CFU-GM em relação ao controle normal;

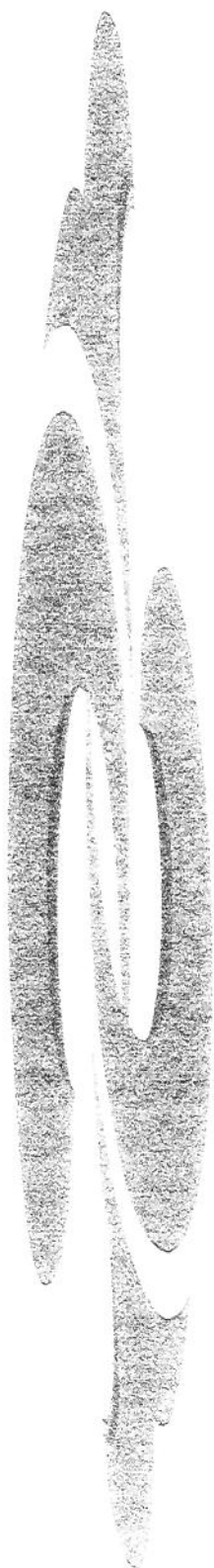
Inibição da hematopoese extramedular esplênica, a qual foi manifestada nos animais portadores do TAE, com as três doses de GR estudadas;

Inibição parcial da concentração de fatores estimuladores de colônias, os quais apresentaram-se significativamente aumentados no soro de animais portadores do TAE;

Aumento de no mínimo 10 % na sobrevivência de animais inoculados com TAE e tratados com 1500 mg/kg e no máximo de 27,5 % com a dose de 500 mg/kg.

Estudos *in vitro*:

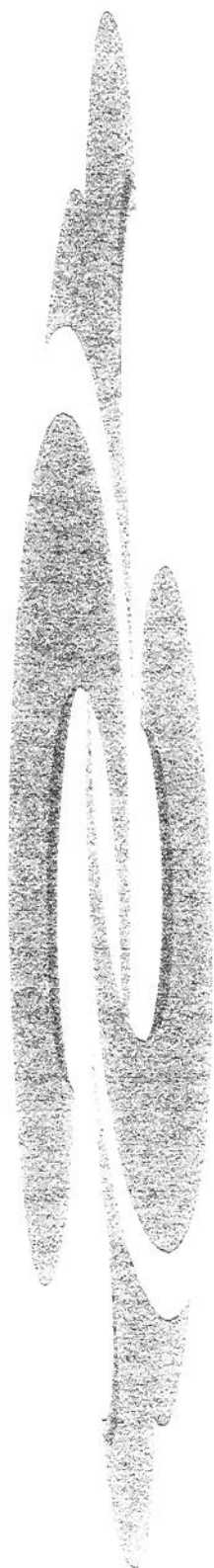
As doses de 100 ou 500 mg/L de GR aumentaram a celularidade e o número de CFU-C no sobrenadante das células do estroma medular de animais normais



7. SUMMARY

Alterations in the hematopoietic response are common in both human and animal tumor system. Thus, in this work we have investigated the hematopoietic response of tumor-bearing mice treated with Royal Jelly, employing the well established Ehrlich ascites tumour (EAT) experimental model. Royal Jelly (RJ) was given orally (500, 1000 and 1500 mg/kg) in a prophylactic-therapeutic manner (20 days before Ehrlich's cells inoculation and during 3, 8 or 13 days after it). Twenty-four hours after the last dose of RJ, the colony forming-unit (CFU-C) on the bone marrow and spleen was measured. Our results demonstrated that the treatment with the three doses of RJ recovery totally the myelosuppression induced by the EAT, starting on the eight day after tumor inoculation. Moreover, the dose of 500 mg/kg increased the number of CFU-C in relation to normal mice. RJ treatment prevented partially, the presence of extramedullary hematopoiesis with the doses of 500 and 1000 mg/kg. Regarding to the colony stimulating activity (CSA), which was enhanced in the serum of EAT-bearing mice, it was partially inhibited when these mice were previously treated with 500 mg/kg of RJ for twenty-eight days.

In relation to the effects of RJ *in vitro*, we have demonstrated that this substance increased the numbers of CFU-C, as well as, the cellularity in the supernatant of cultures treated with 100 or 500 mg/L. The study of survival showed a protection of EAT-bearing mice treated with the three doses of RJ studied, although EAT-bearing mice treated with 500 mg/kg of RJ presented higher rate of survival in relation to 1000 or 1500 mg/kg. The results obtained in this study indicate that RJ produces a modulation on the hematopoiesis medullar and extramedullar in EAT-bearing mice, which is probably related with the increased rate of survival in RJ treated mice.



8. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- ADACHI, N.; YAMAGUCHI, K.; MORIKAWA, T.; SUZUKI, M.; MATSUDA, I.; ABE, M. K. – Constitutive production of multiple colony-stimulating factors in patients with lung cancer associated with neutrophilia. **Br J Cancer**, **69**: 125-129, 1994.
- AIZAWA, S.; HIRAMOTO, M.; ARAKI, S.; NEGISHI, S.; KIMURA, Y.; HOSHI, H.; KOJIMA, S.; WAKASUGI, K. – Stimulatory effects of neopterin on hematopoiesis in vitro are mediated by activation of stromal cells function. **Hematol Oncol**, **16**: 57-67, 1998.
- ALLEN, T. D. & DEXTER, T. M. – The essential cells of the hematopoietic microenvironment. **Exp Hematol**, **12**: 517-521, 1984.
- ALLEVA, D. G.; BURGER, C. J.; ELGERT, K. D. – Interferon- γ reduces tumor-induced Ia macrophage-mediated suppression – Role of prostaglandin E₂ Ia, and TNF- α . **Immunopharmacology**, **25**: 215-227, 1993.
- BALDUCCI, L. & HARDY, C. L. – High proliferation of early hemopoietic progenitors in tumor-bearing mice. **Pathobiology**, **60**: 68-71, 1992.
- BARILIAK, I. R.; BERDYSHEV, G. D.; DUGAN, A. M. – The antimutagenic action of apiculture products. **Tsitol Genet**, **30**: 48-55, 1996.
- BARKER, S. A.; FOSTER, A. B.; LAMB, D.C.; HODGSON, N. – Identification of 10-hydroxy-D 2-decenoic acid in royal jelly. **Nature**, **183**: 996-997, 1959.
- BETZ, M. & FOX, B. S. – Prostaglandin E₂ inhibits production of Th1 lymphokines but not of Th2 lymphokines. **J Immunol**, **146**: 108-113, 1991.
- BLOODWORTH, B. C.; HARN, C. S.; HOCK, C. T.; BOON, Y. O. – Liquid chromatographic determination of trans-10-hydroxy-2-decenoic acid content of commercial products containing royal jelly. **J AOAC Int**, **78**: 1019-1023, 1995.
- BLUM, M. S.; NOVAK, A. F.; TABER, S. – 10-hydroxy-D 2-decenoic acid, an antibiotic found in royal jelly. **Science**, **130**: 452-453, 1959.

- BONTA, I. L. & BEN-EFRAIM, S. – Involvement of inflammatory mediators in macrophage antitumor activity. **J Leukoc Biol**, **57**: 613-626, 1980.
- CHO, Y. T. – Studies on royal jelly and abnormal cholesterol and triglycerides. **Am Bee J**, **117**: 36-38, 1977.
- CLERICI, E.; MOCARRELLI, P.; VILLA, M. L.; NATALE, N. – Influence of Ehrlich ascites carcinoma and repopulating ability of mouse bone marrow cells. **J Natl Cancer Inst**, **47**: 555-560, 1971.
- DELMONTE, L.; LIEBELT, A.; LIEBELT, R. – Granulopoiesis and trombopoiesis in mice bearing transplanted mammary cancer. **Cancer Res**, **26**: 149-159, 1966.
- DEXTER, T. M. – Stromal cell associated hemopoiesis. **J Cell Physiol (Suppl.)**, **1**: 87-94, 1982.
- DEXTER, T.M.; ALLEN, T.D.; LAJTHA, L.G. – Conditions controlling the proliferation of haemopoietic stem cells in vitro. **J Cell Physiol**, **91**: 335-344, 1977.
- EHRLICH, P. & APOLANT, T. – Beobachtungen wiber maligne mausetumoren. **Berliner Klunisch Wochenschrift**, **28**: 871-874, 1905.
- ELGERT, D. K.; ALLEVA, D. G.; MULLINS, D. W. – Tumor-induced immune dysfunction: the macrophage connection. **J Leukoc Biol**, **64**: 275-290, 1998.
- ERNST, E. & CASSILETH, B. R. – How useful are unconventional cancer treatments?. **Eur J Cancer**, **35**: 1608-1613, 1999.
- FECCHIO, D.; RUSSO, M.; SIROIER, P.; BRAQUER, P.; JANCAR, S. – Inhibition of Ehrlich ascites tumor *in vitro* by PAF antagonists. **Int J Immunopharmacol**, **12**: 57-65, 1990b.
- FECCHIO, D.; SIROIS, P.; RUSSO, M.; JANCAR, S. – Studies on inflammatory response induced by Ehrlich Tumor in mice peritoneal cavity. **Inflammation**, **14**: 125-132, 1990a.

- FU, Y.; WATSON, G.; JIMENEZ, J.; WANG, Y.; LOPEZ, D. – Expansion of immunoregulatory macrophages by granulocyte-macrophage colony-stimulating factor derived from a murine mammary tumor. **Cancer Res**, **50**: 227-234, 1990.
- FUJII, A.; KOBAYASHI, S.; KUBOYAMA, N.; FURUKAWA, Y.; KANEKO, Y.; YAMAMOTO, H.; TAMURA, T. – Augmentation of wound healing by royal jelly (RJ) in streptozotocin-diabetic rats. **Jpn J Pharmacol**, **53**: 331-337, 1990.
- FUJIWARA, S.; IMAI, J.; FUJIWARA, M.; YAESHIMA, T.; KAWASHIMA, T.; KOBAYASHI, K. – A potent antibacterial protein in royal jelly. **J Biol Chem**, **265**: 11333-11337, 1990.
- GARCIA-AMOEDO, L. H. G. – **GELÉIA REAL: Análises físico-químicas e químicas úteis para a caracterização e detecção da autenticidade ou adulteração do produto**. São Paulo, 1999. [Tese Mestrado- Universidade de São Paulo]
- GERALD, L.; MANDELL, E.; WILLIAM, A. PETRI JÚNIOR. – Fármacos antimicrobianos. Penicilinas, cefalosporina e outros antibióticos β -lactâmicos. In: GILMAN, A. G. – **As bases farmacológicas da terapêutica**. Rio de Janeiro, McGraw-Hill, 1997. p.790-811.
- GUEST, I. & UETRECHT, J. – Bone Marrow Stem cell protection from chemotherapy by low-molecular-weight compounds. **Exp Hematol**, **29**: 123-137, 2001.
- HAMERLINCK, F. F. – Neopterin: a review. **Exp Dermatol**, **3**: 167- 176. 1999.
- HARDY, C. L. & BALDUCCI, L. – Review: Hemopoietic alterations in cancer. **Am J Med Sci**, **290**: 196-205, 1985.
- HAUSER S. P.; KAJKENOVA O.; LIPSCHITZ D. A. – The pivotal role of interleukin 6 in formation and function of hematopoietically active murine long-term bone marrow cultures. **Stem Cells**, **15**: 125-32. 1997.
- HAYDAK, M. H. – Larval food and development of castes in the honey bee **J Econ Entomol**, **36**: 778-792, 1943.

- HAYDAK, M. H. & PALMER, L. S. – Royal jelly and bee bread as sources of vitamins B1, B2, B6, C and nicotinic and pantothenic acids. **J Econ Entomol**, **35**: 319-320, 1942.
- HILKENS, C. M. U.; VERMCULEN, H.; JOOST-VAN-NEERVEN, R. J.; SINIJDENWINT, F. G. M.; WIERENGA, E. A.; KAPSENBERG, M. L. – Differentiation of T helper type 1 (Th1) and T helper 2 (Th2) cytokine secretion by prostaglandin E₂ critically depends on interleukin-2. **Eur J Immunol**, **25**: 59-63, 1995.
- JUSTO, G. Z.; DÚRAN, N.; QUEIROZ, M. L. S. – Myelopoietic response in tumour-bearing mice by an aggregated polymer isolated from *Aspergillus oryzae*. **Eur J Pharmacol**, **388**: 219-226, 2000.
- JUSTO, G. Z.; SILVA, M. R.; QUEIROZ, M. L. S. – Effects of the green algae *Chlorella vulgaris* on the response of the host hematopoietic system to intraperitoneal Ehrlich ascites tumor transplantation in mice. **Immunopharmacol Immunotoxicol**, **23**: 119-132, 2001.
- KARAALI, A.; MEYDANOGLU, F.; EKE, D. – Studies on composition, freeze-drying and storage of turkish royal jelly. **J Apic Res**, **27**: 182-185, 1988.
- KEEB, G. & LALA, P. K. – Effect of Ehrlich ascites tumour transplantation in mice on the distribution of cells capable of forming hemopoietic colonies in vitro. **Eur J Cancer**, **14**: 331-342, 1978.
- KIMURA, Y.; KAJIYAMA, S.; KANAEDA, J. IZUKAWA, T., YONEKURA, M. – N-linked sugar chains of 55-kDa royal jelly glycoprotein. **Biosci Biotechnol Biochem**, **60**: 2099-2102, 1996.
- KIMURA, Y.; WASHINO, N.; YONEKURA, M. – N-linked sugar chains of 350-kDa royal jelly glycoprotein. **Biosci Biotechnol Biochem**, **59**: 507-509, 1995.
- KOHASHI, M., TOMITA, K., IWAI, K. – Analysis of unconjugated pterins in food resources and human urine. **Agric Biol Chem**, **44**: 2089-2094, 1980.

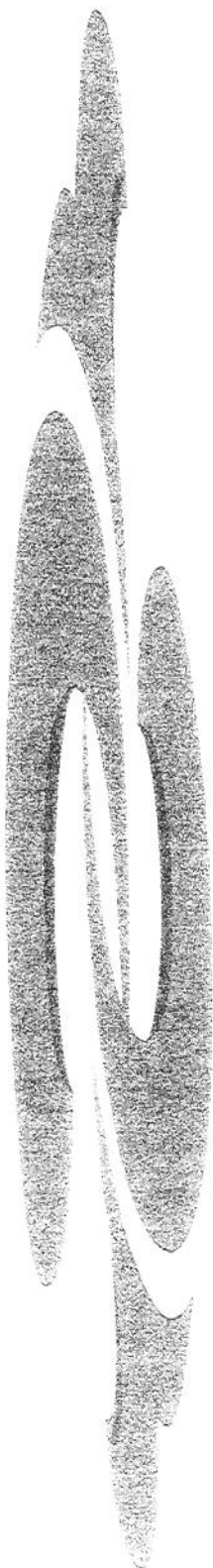
- LALA, P. K.; PARHAR, R. S.; SINGH, P.; LALA, P. K. – Cure of murine Ehrlich ascites tumors with chronic oral indomethacin therapy combined with intraperitoneal administration of LAK cells and IL-2. **Cancer Lett**, **51**: 27-35, 1990.
- LALA, P. K.; TERRIN, M.; LIND, C.; KAIZER, L. – Hematopoietic redistribution in tumor-bearing mice. **Exp Hematol**, **6**: 283-298, 1977.
- LASZLO, J.; LENHARD, R.; DAHLBERG, S.; FEIGL, P. – A profile of treatment approaches used at comprehensive cancer centers. **J Chronic Dis**, **35**: 853-859, 1982.
- LUO, J. C.; YAMAGUCHI, S.; SHINKAI, A.; SHITARA, K.; SHIBUYA, M. – Significant expression of vascular endothelial growth factor/vascular permeability factor in mouse ascites tumors. **Cancer Res**, **58**: 2652-2660, 1998.
- MACINTOSH, L. C. & THOMSON, K. R. – Effects of soluble mediators generated during growth of the Landschutz ascites carcinoma on the chemotaxis of normal and parvum-stimulated peritoneal leucocytes. **Br Exp Pathol**, **65**: 441-445, 1984.
- METCALF, D. – **Clonal culture of hemopoietic cells: techniques and applications**. New York, Elsevier, 1984. P 167.
- MOSMANN, T. – Rapid colorimetric assay for cellular growth and survival: Application to proliferation and cytotoxicity assays. **J Immunol Meth**, **65**: 55-63, 1983.
- NASSIS, C.Z.; RODRIGUES, A. P.; CASSETTARI, A.; LÚCIA, A. M. S.; MELLO, F. R. L. H. – Estudo "in vitro" da atividade antifúngica e antibacteriana da geléia real. **J Bras Med**, **69**: 80-95, 1995.
- NELSON, J. A. S.; PARHAR, R. S.; SCODRAS, J. M.; LALA, P. K. – Down-regulation of macrophage I-A expression in tumor-bearing mice. **J Leukoc Biol**, **48**: 394-402, 1990.

- PARHAR, R. S. & LALA, P. K. – Prostaglandin E₂ – mediated inactivation of various killer lineage cells by tumor-bearing host macrophages. **J Leukoc Biol**, **44**: 185-190, 1988.
- PARKER, A. N. & PRAGNELL, I. B. – Inhibitors of haemopoiesis and their potential clinical relevance. **Blood Rev**, **9**: 226-233, 1995.
- PATEL, N. G.; HAYDAK, M. H.; GOCHNAUER, T. A. – Electrophoretic components of the proteins in honey bee larval food. **Nature**, **186**: 633-364, 1960.
- PESSINA, A.; BRAMBILLA, P.; BELLA, S.; MAOCARELLI, P. – CFU-S and CFU-C proliferation after treatment of normal bone marrow cells with Ehrlich ascitic fluid. **Oncology**, **39**: 391-395, 1982a.
- PESSINA, A.; BRAMBILLA, P.; BELLA, S.; MAROCCHI, A.; MAOCARELLI, P. – Factors produced by macrophages and tumour cells: influence on the granulocytic precursor cells (CFU-C) in normal and tumour bearing mice. **J Cancer Res Clin Oncol**, **102**: 235-244, 1982b.
- PRATT, J. J. & HOUSE, H. L. – A qualitative analysis of the amino acids in royal jelly. **Science**, **110**: 9-10, 1949.
- QUEIROZ, M. L. S.; JUSTO, G. Z.; VALADARES, M. C.; PEREIRA DA SILVA, F. R.; MULLER, A. H. – Adjuvant effect of *Pluchea quitoc* extract on the resistance of tumor-bearing mice by modulation of the host hematopoietic response. **Immunopharmacol Immunotoxicol**, **23**: 215-228, 2001.
- RAFFERTY, J. A.; HICKSON, I.; LASHFORD, L. S.; MARGISON, G. P.; DEXTER, T. M.; FAIRBAIRN, L. J. – Chemoprotection of normal tissues by transfer of drug resistance genes. **Cancer Metastasis Rev**, **15**: 365-383, 1996.
- RUIZ DE MORALES, J.; VÉLEZ, D.; SUBIZA, J. L. – Ehrlich tumor stimulates extramedullar hematopoiesis in mice without secreting identifiable colony-stimulating factors and without engagement of host T cells. **Exp Hematol**, **27**: 1757-1767, 1999.

- RUSZALA-MALLON, V.; SILVA, J.; LUMANGLAS, A. L.; DURR, F. E.; WANG, B. S. – Depression of cell-mediated immunity in paltomycytoma-bearing mice. **Immunol Cell Biol**, **63**: 11-16, 1991.
- SEGURA, J. A.; BARBERO, L. G.; MÁRQUEZ, J. – Early tumor effect on splenic Th lymphocytes in mice. **FEBS Letters**, **414**: 1-6, 1997.
- SEGURA, J. A.; BARBERO, L. G.; MARQUEZ, J. – Ehrlich ascites tumour unbalances splenic cell populations and reduces responsiveness of T cells to Staphylococcus aureus enterotoxin B stimulation. **Immunol Lett**, **74**: 111-115, 2000.
- SEGURA, J. A.; RUIZ-BELLIDO, A.; ARENAS, M.; LOBO, C. MÁRQUEZ, J.; ALONSO, F. J. – Ehrlich ascites tumor cells expressing anti-sense glutaminase mRNA lose their capacity to evade the mouse immune system. **Int J Cancer**, **91**: 379-384, 2001.
- SIGIURA, K – Tumor transplantation. In: W.I. Gray, ed. - **Methods of animal experimentation**. New York, Academic New Yirjm, 1965. p.171-172. v. 2.
- SMITH, T. C. & LEVINSON, C. – Ehrlich ascitic tumor cell surface labeling and kinetics of glycocalyx release. **J Supramol Struct**, **12**: 115-125 1979.
- SUBIZA, J.L.; COLL, J.; ALVARES, R.; VALDIVIESO, M.; DE LA CONCHA, E.G. – IgM response and resistance to ascites tumor growth. **Cancer Immunol Immunother**, **25**: 87-92, 1987.
- SVER, L.; ORSOLIC, N.; TADIC, Z.; NJARI, B.; VALPOTIC, I. – A royal jelly as a new potential immunomodulator in rats and mice. **Comp Immun Microbiol Infect Dis**, **19**: 31-38, 1996.
- TAKAHASHI, M.; MARUYAMA, S.; MORIYAMA, Y.; SHIBATA, A. – Applicability of antimyeloid monoclonal antibodies (L4F3, 1G10) to autologous bone marrow transplantation for patients with acute myelogenous leukemia. **Transplant Proc**, **24**: 416-418, 1992.

- TAMURA, T.; FUJII, A. KUBOYAMAN, N. – Antitumor effects of Royal Jelly (RJ). **Folia Pharmacol Jap**, **89**: 78-80, 1987.
- TOMIDA, M.; YAMAMOTO-YAMAGUCHI, Y.; HOZUMI, M. – Purification of a factor inducing differentiation of mouse myeloid leukemic M1 cells from conditioned medium of mouse fibroblast L929 cells. **J Biol Chem**, **259**: 10978-82. 1984.
- TOWNSEND, G. F., MORGAN, J. F., HAZLETT, B. – Activity of 10-hydroxydecenoic acid from royal jelly against experimental leukaemia and ascitic tumours. **Nature**, **183**: 1270-71, 1959.
- VALADARES, M. C.; KLEIN, S.I.; ZYNGIER, S.; QUEIROZ, M. L. S. – Growth and differentiation of bone marrow hematopoietic cells in mice bearing Ehrlich ascite tumor and treated with Dicyclopentadienildichlorotitanium (IV). **Int J of Immunopharmacol**, **20**: 573-581, 1998.
- VAN DEN ENGH, G. J. & BOL, S. – The presence of a CSF enhancing activity in the serum of endotoxin treated mice. **Cell Tiss Kinet**, **8**: 579-587, 1975.
- VERHOEF, M. J.; HILSDEN, J. R.; BEIRNE, M. O. – Complementary therapies and cancer care: an overview. **Patient Education Counseling**, **38**: 93-100, 1999.
- VIÑUELA, J. E.; RODRÍGUEZ, R.; GIL, J.; COLL, J.; DE LA CONCHA, E. G.; SUBIZA, J. L. – Antigen shedding vs. Development of natural suppressor cells as mechanism of tumor escape in mice bearing Ehrlich tumor. **Int J Cancer**, **47**: 86-91, 1991.
- WALKER, T. M., BURGER, C. J., ELGERT, K. – Tumor growth alters T cell and macrophage production of and responsiveness to granulocyte-macrophage colony-stimulating factor: Partial dysregulation through interleukin-10. **Cell Immunol**, **154**: 342-357.1994.
- WEAVER, N. & KUIKEN, K. A. – Quantitative analysis of the essential amino acids of royal jelly and some pollens. **J Econ Entomol**, **44**: 635-638, 1951.

- WEAVER, N.; JOHNSTON, N. C.; BENJAMIN, R.; LAW, J. H. – Novel fatty acids from the royal jelly of honey bees (*Apis mellifera*, L.). **Lipids**, **3**: 535-538, 1969.
- WHITNEY, R. B.; KELLY, B. S.; LEVY, J.G. – Immunosuppression in mice bearing primary tumors. **Eur J Cancer**, **14**: 699-705, 1978.
- YAMAGUSHI, N. H. & INOCÊNCIO, C. G. – Imunologia dos tumores, **Vitrô**, **1**: 68-72, 1993.
- YAMAMOTO, T.; ZOU, J. P.; LI, X. F.; TAKENADA, H.; NODA, S.; FUJII, T; DOBAYASHI, Y.; MUKIDA, N., MATSUSHIMA, K.; FUJIWARA, H.; MAMAODA, T. – Regulatory mechanisms for production of INF- γ and TNF by T-cells or macrophages in tumor-bearing state. **J Immunol**, **154**: 2281-90, 1995.
- YOUNG, M. R. & HOWVER, C. S. – Inhibition of spleen cells cytotoxic capacity toward tumor by elevated prostaglandin E₂ levels in mice bearing Lewis lung carcinoma. **J Immunother**, **10**: 326-335, 1986.
- YOUNG, M. R. L. & WRIGHT, M. A. – Myelopoiesis-associated immune suppressor cells in mice bearing metastatic Lewis lung carcinoma tumors: interferon- γ plus TNF- α synergistically reduce immune suppressor and tumor growth-promoting activities of bone marrow cells and diminish tumor recurrence and metastasis. **Cancer Res**, **52**: 6335-6340, 1992.



9. APÊNDICE

Tabela 3: Efeitos da GR sobre o crescimento e diferenciação de precursores hematopoéticos da medula óssea em camundongos BALB-c inoculados com o TAE e tratados com 500 mg/kg.

CFU-GM/fêmur								
<i>500 mg/kg (x 10³)</i>								
N	CTRL	GR	TAE 3 dias	TAE 8 dias	TAE 13 dias	TAE/GR 23 dias	TAE/ GR 28 dias	TAE / GR 33 dias
1	15,75	16,9	4,20	6,67	9,24	6,65	16,96	17,96
2	14,98	15,7	4,75	6,60	9,10	6,67	15,53	18,53
3	12,10	15,0	3,68	6,25	8,89	6,99	16,31	19,31
4	14,03	16,3	2,84	6,83	8,51	6,63	14,28	17,28
5	16,60	16,7	4,29	6,51	8,00	7,00	18,00	21,00
6	18,75	16,1	4,81	6,90	9,34	7,01	14,98	18,79
X	15,36	16,1	4,09	6,65	8,85	6,86	15,16	18,70
DP	2,26	0,71	0,72	0,24	0,51	0,17	1,73	1,33

CTRL: controle.

GR: animais tratados por via gavagem com GR (500 mg/kg) por 20 dias consecutivos.

TAE: animais portadores do TAE (3, 8 e 13 dias).

TAE/GR: animais portadores do TAE e tratados com GR (500 mg/Kg) por 23, 28 e 33 dias.

Tabela 4: Efeitos da GR sobre o crescimento e diferenciação de precursores hematopoéticos da medula óssea em camundongos BALB-c inoculados com o TAE e tratados com 1000 mg/kg.

CFU-GM/fêmur								
<i>1000 mg/kg (x 10³)</i>								
N	CTRL	GR	TAE 3 dias	TAE 8 dias	TAE 13 dias	TAE/GR 23 dias	TAE/ GR 28 dias	TAE / GR 33 dias
1	15,75	17,60	4,20	6,67	9,24	6,78	13,12	16,85
2	14,98	14,70	4,75	6,60	9,10	5,63	13,66	16,38
3	12,10	15,00	3,68	6,25	8,89	5,50	13,29	15,85
4	14,03	16,70	2,85	6,83	8,51	5,76	13,50	15,00
5	16,60	16,70	4,29	6,51	8,00	6,19	14,00	17,09
6	18,75	16,00	4,81	6,90	9,34	6,02	13,42	16,20
X	15,36	16,00	4,09	6,65	8,85	5,88	13,00	16,00
DP	2,26	1,1	0,72	0,24	0,51	0,29	0,31	0,76

CTRL: controle.

GR: animais tratados por via gavagem com GR (1000 mg/kg) por 20 dias consecutivos.

TAE: animais portadores do TAE (3, 8 e 13 dias).

TAE/GR: animais portadores do TAE e tratados com GR (500 mg/Kg) por 23, 28 e 33 dias.

Tabela 5: Efeitos da GR sobre o crescimento e diferenciação de precursores hematopoéticos da medula óssea em camundongos BALB-c inoculados com o TAE e tratados com 1500 mg/kg.

CFU-GM/fêmur								
<i>1500 mg/kg (x 10³)</i>								
N	CTRL	GR	TAE 3 dias	TAE 8 dias	TAE 13 dias	TAE/GR 23 dias	TAE/GR 28 dias	TAE/GR 33 dias
1	15,75	17,94	4,20	6,67	9,24	6,88	12,38	17,00
2	14,98	12,72	4,75	6,60	9,10	6,89	13,02	15,17
3	12,10	14,00	3,68	6,25	8,89	6,60	11,65	14,29
4	14,03	14,37	2,84	6,83	8,51	6,11	11,25	18,10
5	16,60	16,70	4,29	6,51	8,00	6,10	12,87	17,98
6	18,75	16,94	4,81	6,90	9,34	6,33	11,53	16,84
X	15,36	15,45	4,09	6,65	8,85	6,33	12,13	16,70
DP	2,268	2,035	0,72	0,24	0,51	0,36	0,74	1,52

CTRL: controle.

GR: animais tratados por via gavagem com GR (1500 mg/kg) por 20 dias consecutivos.

TAE: animais portadores do TAE (3, 8 e 13 dias).

TAE/GR: animais portadores do TAE e tratados com GR (1500 mg/Kg) por 23, 28 e 33 dias.

Tabela 6: Efeitos da GR sobre o crescimento e diferenciação de precursores hematopoéticos do baço em camundongos BALB-c inoculados com o TAE e tratados com 500 mg/kg.

CFU-GM/baço								
<i>500 mg/kg ($\times 10^2$)</i>								
N	CTRL	GR	TAE 3 dias	TAE 8 dias	TAE 13 dias	TAE/GR 23 dias	TAE/GR 28 dias	TAE/GR 33 dias
1	9,83	9,63	21,28	41,00	58,22	12,68	17,33	18,72
2	9,45	9,33	22,00	34,60	54,00	11,44	16,90	16,21
3	9,77	9,01	23,00	33,80	59,00	12,64	16,64	20,71
4	9,08	9,21	25,12	32,00	50,00	11,53	13,04	16,03
5	9,60	9,31	22,72	40,00	52,30	12,32	18,90	19,86
6	9,62	9,31	22,88	36,10	54,92	12,10	16,43	18,26
X	9,96	9,86	23,18	36,50	56,00	12,00	15,80	18,00
DP	0,499	0,56	1,546	3,554	18,21	0,569	2,197	1,471

CTRL: controle.

GR: animais tratados por via gavagem com GR (500 mg/kg).

TAE: animais apenas portadores do TAE.

TAE/GR: animais portadores do TAE e tratados com GR.

Tabela 7: Efeitos da GR sobre o crescimento e diferenciação de precursores hematopoéticos do baço em camundongos BALB-c inoculados com o TAE e tratados com 1000 mg/kg.

CFU-GM/baço								
<i>1000 mg/kg ($\times 10^2$)</i>								
N	CTRL	GR	TAE 3 dias	TAE 8 dias	TAE 13dias	TAE/GR 23 dias	TAE/GR 28 dias	TAE/GR 33 dias
1	9,83	10,63	21,28	41,00	58,22	11,47	11,87	10,00
2	9,45	10,33	22,00	34,60	54,00	12,80	12,40	21,89
3	9,77	10,01	23,00	33,80	59,00	12,10	19,86	28,00
4	9,08	9,21	25,12	32,00	50,00	11,20	16,86	21,14
5	9,60	9,31	22,72	40,00	52,30	12,64	14,91	17,96
6	9,62	9,89	22,88	36,10	54,92	12,58	15,24	14,35
X	9,96	9,86	23,18	36,50	56,00	12,13	15,58	19,10
DP	0,499	0,562	1,546	3,554	18,21	0,665	3,216	6,124

CTRL: controle.

GR: animais tratados por via gavagem com GR (1000 mg/kg).

TAE: animais apenas portadores do TAE.

TAE/GR: animais portadores do TAE e tratados com GR.

Tabela 8: Efeitos da GR sobre o crescimento e diferenciação de precursores hematopoéticos do baço em camundongos BALB-c inoculados com o TAE e tratados com 1500 mg/kg.

CFU-GM/baço								
<i>1500 mg/kg ($\times 10^2$)</i>								
N	CTRL	GR	TAE 3 dias	TAE 8 dias	TAE 13 dias	TAE/GR 23 dias	TAE/GR 28 dias	TAE/GR 33 dias
1	9,83	10,23	21,28	41,00	58,22	13,70	20,87	32,20
2	9,45	10,02	22,00	34,60	54,00	12,80	18,40	30,70
3	9,77	10,60	23,00	33,80	59,00	14,40	17,51	22,64
4	9,08	9,28	25,12	32,00	50,00	12,32	11,10	27,72
5	9,60	9,61	22,72	40,00	52,30	12,00	11,52	25,59
6	9,62	9,86	22,88	36,10	54,92	12,54	15,86	27,70
X	9,96	9,94	23,18	36,50	56,00	12,00	15,76	27,33
DP	0,499	0,464	1,546	3,554	18,21	0,919	3,903	3,544

CTRL: controle.

GR: animais tratados por via gavagem com GR (1500 mg/kg).

TAE: animais apenas portadores do TAE.

TAE/GR: animais portadores do TAE e tratados com GR.

Tabela 9: Variação do peso do baço de camundongos BALB-c inoculados com o TAE e tratados com 500 mg/kg

Peso do baço (gramas)								
<i>500 mg/kg</i>								
N	CTRL	GR	TAE 3 dias	TAE 8 dias	TAE 13 dias	TAE/GR 23 dias	TAE/GR 28 dias	TAE/GR 33 dias
1	0,14	0,16	0,20	0,26	0,33	0,29	0,27	0,313
2	0,16	0,15	0,20	0,23	0,31	0,28	0,30	0,34
3	0,19	0,15	0,21	0,22	0,32	0,19	0,32	0,28
4	0,16	0,16	0,21	0,23	0,31	0,19	0,31	0,28
5	0,15	0,16	0,22	0,25	0,36	0,18	0,28	0,32
6	0,16	0,16	0,21	0,26	0,49	0,25	0,28	0,39
X	0,16	0,16	0,21	0,24	0,36	0,23	0,29	0,37
DP	0,02	0,01	0,01	0,02	0,07	0,05	0,02	0,14

CTRL: controle.

GR: animais tratados por via gavagem com GR (500 mg/kg).

TAE: animais apenas portadores do TAE.

TAE/GR: animais portadores do TAE e tratados com GR.

Tabela 10: Variação do peso do baço de camundongos BALB-c inoculados com o TAE e tratados com 1000 mg/kg.

Peso do baço (gramas)								
<i>1000 mg/kg</i>								
N	CTRL	GR	TAE 3 dias	TAE 8 dias	TAE 13 dias	TAE/GR 13 dias	TAE/GR 28 dias	TAE/GR 33 dias
1	0,14	0,16	0,20	0,26	0,33	0,19	0,29	0,29
2	0,16	0,15	0,20	0,22	0,31	0,19	0,26	0,36
3	0,19	0,15	0,21	0,22	0,32	0,16	0,28	0,37
4	0,16	0,16	0,21	0,23	0,31	0,17	0,29	0,33
5	0,148	0,16	0,22	0,25	0,36	0,18	0,30	0,36
6	0,156	0,17	0,21	0,26	0,49	0,13	0,30	0,34
X	0,16	0,16	0,21	0,24	0,35	0,17	0,28	0,34
DP	0,02	0,01	0,01	0,02	0,07	0,02	0,01	0,03

CTRL: controle.

GR: animais tratados por via gavagem com GR (1000 mg/kg).

TAE: animais apenas portadores do TAE.

TAE/GR: animais portadores do TAE e tratados com GR.

Tabela 11: Variação do peso do baço em camundongos BALB-c inoculados com o TAE e tratados com 1500 mg/kg.

Peso do baço (gramas)								
<i>1500 mg/kg</i>								
N	CTRL	GR	TAE 3 dias	TAE 8 dias	TAE 13 dias	TAE/GR 23 dias	TAE/GR 28 dias	TAE/GR 33 dias
1	0,14	0,16	0,20	0,26	0,33	0,25	0,30	0,39
2	0,16	0,15	0,20	0,23	0,31	0,21	0,24	0,49
3	0,19	0,15	0,21	0,22	0,32	0,20	0,31	0,40
4	0,16	0,16	0,21	0,23	0,31	0,15	0,28	0,47
5	0,15	0,16	0,22	0,25	0,36	0,15	0,24	0,35
6	0,16	0,17	0,20	0,26	0,49	0,23	0,21	0,40
X	0,16	0,16	0,21	0,24	0,35	0,20	0,27	0,41
DP	0,02	0,01	0,01	0,02	0,07	0,04	0,04	0,02

CTRL: controle.

GR: animais tratados por via gavagem com GR (1500 mg/kg).

TAE: animais apenas portadores do TAE.

TAE/GR: animais portadores do TAE e tratados com GR.

Tabela 12: Efeitos da GR sobre a produção de fatores estimuladores de colônia de células precursoras hematopoéticas em camundongos BALB-c inoculados com o TAE e tratados com 500 mg/kg.

Fatores estimuladores de colônias				
Unidades/mL				
N	CTRL	GR	TAE 8 dias	TAE/GR 28 dias
1	0,6	0,9	4,73	2,84
2	0,5	0,8	4,47	2,55
3	1,2	1,0	5,86	3,17
4	0,7	1,0	3,76	2,14
5	1,8	1,0	4,75	2,83
6	1,5	1,3	5,17	3,86
X	1,05	1,00	4,40	2,43
DP	0,532	0,259	0,879	0,616

CTRL: controle.

GR: animais tratados por via gavagem com GR (500 mg/kg).

TAE: animais apenas portadores do TAE.

TAE/GR: animais portadores do TAE e tratados com GR.

Tabela 13: Efeitos da GR sobre o estroma medular *in vitro* de camundongos BALB-c normais.

Semanas	N. de cels. em suspensão $\times 10^5$ estroma normal	N. de cels. em suspensão $\times 10^5$ estroma tratado com GR	CFU-GM da suspensão de estroma normal	CFU-GM da suspensão de estroma tratado com GR
5 ^a	45 \pm 3,3	140 \pm 7,2	0	0
6 ^a	15 \pm 2,8	58 \pm 6,2	0	0
7 ^a	6 \pm 1,1	60 \pm 3,6	0	0
8 ^a	8 \pm 2,2	8 \pm 2,4	15 \pm 5,6	50 \pm 3,4
9 ^a	5 \pm 1,3	10 \pm 3,4	58 \pm 5,8	61 \pm 2,8
10 ^a	10 \pm 3,5	12 \pm 3,9	44 \pm 4,6	66 \pm 2,5